Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

P4228

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

I. N. R. A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
25. OCT. 1982
UNITE CENTRALE DE VERSAILLES

7

1978

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

LB-8

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS..... p. 1 à 2

COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE..... p. 3 à 53

Première Partie : Fin du programme " Acide Ascorbique ".

EFFETS COMPARES DES ACIDES ASCORBIQUE ET DEHYDRO-ASCORBIQUE SUR LA GLYCEMIE ET L'AMINO-ACIDEMIE DE *Laspereysia pomonella* (*Lépid. Tortricidae*)..... p. 4 à 10

Deuxième partie : Programme sur la Régulation de la Glycémie de l'Abeille et ses applications.

Chap.I- ASPECTS ENZYMOLOGIQUES..... p.11 à 33

I-1. Détermination rigoureuse des paramètres cinétiques.
a) Programme de calcul sur carte magnétique..... p.11 à 14
b) Les α-glucosidases nymphales..... p.14 à 15
c) La Phosphatase alcaline de l'intestin d'Abeille..... p.15 à 17

I-2. Relations entre la Glycémie et les α-Glucosidases.
a) Bilan de l'action du Glucose *in vitro*..... p.18
b) Relations entre Vitesse maximale et Glycémie..... p.18
c) Relations entre constantes d'affinité et glycémie..... p.18 à 22
d) Relations entre le coefficient de HILL et la glycémie..... p.22 à 24

I-3. Etude du mécanisme moléculaire d'inhibition de l'α-glucosidase par le Glucose.
a) Variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en inhibiteur *in vitro*..... p.25 à 28
b) Relations entre les coefficients de HILL initial (n_O) et résultant (n_R) en fonction de la concentration en Inhibiteur..... p.28 à 29

I-4. Théorie et Hypothèses sur le Mécanisme moléculaire de fonctionnement de l'α-Glucosidase.
a) Bases théoriques..... p.30 à 33
b) La sanction de la vérification expérimentale..... p.33

Chap.II- ASPECTS HORMONAUX..... p.34 à 43

II-1. Matériel et Méthodes..... p.34

II-2. Action de l'Adrénaline..... p.35 à 38

II-3. Action de l'Insuline..... p.39 à 40

II-4. Action du Glucagon..... p.41 à 42

II-5. Discussion..... p.43

Chap.III- APPLICATIONS AGRONOMIQUES..... p.44 à 47

III-1. Glycémie et Productivité..... p.44 à 46

III-2. Phosphatases et Productivité..... p.47

Chap.IV- DISCUSSION GENERALE..... p.48 à 49

.../...

Troisième partie : Projets expérimentaux et Bibliographie.

I- PROJETS..... p.50 à 51
A- A court terme (1 an à 2 ans maximum)..... p.50
B- A moyen terme (2 à 5 ans)..... p.50 à 51
C- A long terme (plus de 5 ans)..... p.51

II- BIBLIOGRAPHIE DU LABORATOIRE..... p.52
A- Titres parus..... p.52
B- Publications en cours de rédaction..... p.52 à 53

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF..... p.54 à 56

I- BILANS..... p.54 à 55
A- Equipement..... p.54
B- Fonctionnement..... p.54 à 55

II- PREVISIONS 1979..... p.56

CONCLUSION..... p.57 à 58

AVANT - PROPOS

AVANT PROPOS

L'insertion d'une nouvelle unité de Recherche Biochimique au sein d'un organisme agronomique comporte un épineux problème quant à la définition de ce que doit être la vocation d'une telle Unité.

... Une orientation trop " appliquée " limiterait sa propre portée scientifique à long terme.

... Une voie trop " fondamentale " ne manquerait pas de susciter des critiques en sens opposé !

... Dans les deux cas, assigner des limites *a priori* aux ambitions d'un laboratoire de Recherches reste, en outre, une opération scientifique négative, fût-elle dictée par des considérations de simple prudence eu égard aux moyens disponibles.

A l'échéance 1978, 5 années se sont écoulées depuis la mise en place effective du laboratoire de Biochimie, qui s'est donc efforcé au fil des mois, de définir cette vocation en s'appuyant sur la progression de ses travaux : le moment est venu, aujourd'hui, de dévoiler très concrètement les objectifs et le fil conducteur, illustrés par les résultats d'une première phase importante de leur réalisation.

Après une période d'installation provisoire (1973-74) inévitablement consacrée à résoudre quelques problèmes ponctuels ressentis comme urgents par les zoologistes (vitamine C chez les Lépidoptères phytophages, protéinémie de l'Abeille et de Lépidoptères, composants biochimiques des pucerons, des coccinelles et des oeufs de Lépidoptères-hôtes), le laboratoire s'est attaché à élaborer les bases cohérentes d'une Recherche de plus large portée, fondée sur l'Hypothèse générale suivante :

Postulat : " La plupart des phénomènes entomologiques intéressant l'Agriculture sont — au moins en partie — assujettis à un déterminisme lié aux capacités énergétiques des individus ".

Corollaire : Améliorer les connaissances biochimiques dans ce domaine (aspect " fondamental ") devrait donc permettre aussi — par simple conséquence — d'ouvrir des voies originales d'approche de nombreux problèmes agronomiques actuels ... et futurs (phase d' " intérêt économique ").

L' Abeille a été choisie comme modèle de départ, avec pour incidence économique : la productivité des colonies, et pour support biochimique fondamental : l'existence éventuelle d'une régulation de la glycémie.

Il n'est pas inutile de rappeler, brièvement, que plusieurs années ont été laborieusement consacrées à la mise à jour d'un mécanisme enzymatique de contrôle de la glycémie dans l'hémolymphe, au prix d'études approfondies (expérimentales et théoriques) des mécanismes cinétiques du fonctionnement de l'α-glucosidase (1974-77).

.../...

La voie hormonale, abordée en 1975 avec un premier essai d'administration *per os* d'adrénaline et d'insuline révélait d'autre part une perspective encourageante. En 1978, l'autonomie budgétaire du laboratoire de Biochimie, enfin passée au stade de la réalité concrète, permettait une meilleure coordination des travaux : le rendement expérimental s'en est trouvé considérablement amélioré et le processus scientifique a pu être accéléré jusqu'à aboutir à la démonstration de l'activité des hormones : adrénaline, insuline, glucagon, administrées par injections, sur la glycémie de l'Abeille, puis, au mois de décembre, à une première vérification concrète de l'hypothèse de départ : mise en évidence d'une corrélation étroite entre la productivité et le niveau de la glycémie (ce dernier pouvant être maintenant considéré comme étant significatif, puisque reflétant un équilibre de régulation).

De nombreuses publications relatives aux résultats acquis au cours de 1977 et 1978 ne verront le jour que dans un délai de 1 à 2 ans : c'est pourquoi ce rapport a été rédigé de façon suffisamment détaillée pour permettre au lecteur de se faire une idée assez précise des travaux effectués : naturellement, pour la même raison, compte tenu des questions de concurrence pour l'antériorité, le contenu du document reste pour l'instant strictement confidentiel (Dépôt sous pli cacheté à la Sté chimique de France).

.../...

COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE

COMPTE RENDU

SCIENTIFIQUE

La plus grande partie de ce rapport sera consacrée aux travaux sur la régulation de la glycémie de l'Abeille et ses applications agronomiques.

Il convenait, cependant de présenter également les bilans de la 4e et dernière phase des recherches sur la " Vitamine C " chez les Lépidoptères phytophages, dont les dernières données numériques n'ont pu être extraites qu'en 1977-78.

.../...

Première Partie

Fin du programme " Acide Ascorbique "

EFFETS COMPARES DES ACIDES ASCORBIQUE ET DEHYDRO-ASCORBIQUE SUR LA GLYCEMIE ET L'AMINO-ACIDEMIE DE *Laspereysia pomonella* (Lepid. Tortricidae).

Introduction

Le But de l'expérience était de préciser l'influence des doses administrées, depuis la carence, jusqu'à l'excès, et de comparer l'efficacité de la forme oxydée (DHASC) à celle de la forme réduite (ASC), en raison de la dégradation observée dans les milieux nutritifs artificiels (BOUNIAS & BONNOT 1976, *Ann. Zool.*, 8, 481-492).

Matériel et Méthodes

Des larves de *Laspereysia pomonella* élevées individuellement sur milieu artificiel aseptique, grâce au concours de Madame IVALDI, à la Station INRA de Cyto-pathologie de St Christol les Alès, ont reçu des doses croissantes d'acide ascorbique (ASC) et déhydro-ascorbique (DHASC) selon les principes et procédés chimiques mis au point au laboratoire de Biochimie (BOUNIAS 1978, *Ann. Zool.*, 10, 289-302 ; BOUNIAS & BONNOT 1977, *Ann. Zool.*, 9, 733-748). Les larves ont été analysées au 5e stade. L'étude de la croissance devrait faire l'objet d'une note particulière (IVALDI).

Les glucides et les amino-acides libres ont été analysés dans l'hémolymphe (prélevée à l'aide de micro-seringues Hamilton) au moyen de micro-techniques de chro-matographie quantitative en couche mince (BOUNIAS 1975, *Analusis*, 4, 87-93 ; 1979, *Analusis*, en préparation).

Tous les résultats ont été comparés à ceux obtenus à partir de larves élevées sur poudre de pomme, c'est-à-dire l'aliment naturel.

Résultats

Les poids moyens des insectes analysés sont indiqués dans le tableau suivant (expression en mg).

.../...

Tableau 1

Equiv. mM	Série ASC				Série DHASC			
	Dose g/200 g milieu	Poids mg	(N)	σ_x	Dose	Poids mg	(N)	σ_x
0	0	4,44	(8)		0	4,50	(4)	0,45
3,7	0,125 (1)	4,50	(5)		0,125 (1)	4,81	(26)	0,70
	0,125 (2)	50,3	(13)	11,5	0,125 (2)	37,0	(3)	16,0
7,5	0,25	59,8	(10)	7,8	—	—	—	—
15	0,50	46,02	(13)	10,7	0,50	50,5	(8)	7,5
30	1,0	43,8	(8)	8,0	1,0	50,4	(10)	1,07
60	2,0	49,5	(9)	18,30	2,0	59,5	(6)	12,9
120	4,0	51,4	(10)	2,97	—	—	—	—

Témoins/poudre de pommes : 49,5 (4) 6,45.

Les résultats d'analyse des glucides et amino-acides sont illustrés par les figures suivantes (fig. 1 a-b-c-d-e). Les données numériques complètes sont indiquées dans les tableaux 2 et 3.

Cèrtaines observations peuvent être directement dégagées de ces résultats

1°- La dose 0,125 (3,7 mM) constitue un seuil critique, puisqu'une partie des larves présente les signes caractéristiques de la carence.

2°- Les amino-acides se divisent en 3 classes : pour certains, la teneur est minimale pour les doses optimales d'ASC ou DHASC et excessive dans les conditions de carence ou d'excès, d'autres restent sans variations interprétables. Les derniers croissent asymptotiquement avec les doses.

3°- Les glucides réagissent diversement : glucose et fructose suivent les mêmes variations que la 1ère classe d'amino-acides décrite ci-dessus, tandis que le tréhalose réagit de manière exactement opposée.

4°- Les teneurs observées dans les conditions optimales se rapprochent de celles mesurées chez les Insectes recevant leur nourriture naturelle. En conditions artificielles, les meilleurs résultats sont obtenus avec une concentration d'ASC comprise entre 15 et 30 mM (soit entre 0,5 et 1 g pour 200 g de milieu).

5°- La forme oxydée (DHASC) présente la même efficacité que la forme réduite (ASC) ce qui explique l'incidence assez limitée de l'oxydation dans les milieux nutritifs sur la croissance des larves.

.../...

Tableau 2 - Influence comparée de la concentration en acide ascorbique (ASC) et en acide déhydro-ascorbique (DHASC) du milieu nutritif sur la glycémie des larves de *Laspereysia pomonella*.

Doses : ASC mM	Tréhalose $\bar{x}$ (N) σ	Glucose $\bar{x}$ (N) σ	Fructose $\bar{x}$ (N) σ	Saccharose $\bar{x}$ (N) σ
0	16,40 (15) 4,1	9,78 (15) 3,66	0,58 (11) 0,48	1,94 (15) 1,55
3,7 f	1,44 (2) 0,16	2,15 (2) 3,04	0,11 (2) 0,16	1,13 (2) 1,06
3,7 f	19,10 (12) 3,58	1,7 (11) 0,82	0,40 (11) 0,27	0,92 (9) 1,58
7,5	19,70 (3) 7,20	0,88 (2) 0,035	0,12 (2) 0,30	3,25 (2) 0,35
15	35,32 (18) 11,9	0,81 (13) 0,54	0,14 (11) 0,122	2,04 (5) 3,18
30	29,17 (9) 5,4	0,88 (10) 0,48	0,51 (16) 0,50	1,10 (8) 1,98
620	15,64 (8) 2,74	1,08 (12) 0,81	0,43 (15) 0,40	0,97 (8) 1,75
120	19,00 (11) 4,05	1,92 (10) 0,44	1,10 (13) 0,77	0,44 (4) 0,12
Doses : DHASC mM				
0	10,03 (3) 3,73	4,38 (3) 1,85	2,22 (3) 1,83	1,56 (3) 1,93
3,7 f	12,02 (12) 3,98	2,79 (10) 0,57	0,47 (10) 0,16	0,60 (10) 0,37
3,7 f	16,15 (10) 3,92	2,04 (8) 0,53	0,46 (10) 0,32	0,37 (9) 0,19
15	16,90 (4) 8,07	1,30 (3) 0,53	0,62 (2) 0,36	2,06 (4) 3,9
30	14,80 (6) 4,68	1,19 (5) 1,13	0,75 (5) 0,42	2,89 (6) 2,58
60	13,5 (3) 4,20	5,71 (4) 1,91	0,98 (3) 0,55	1,60 (3) 2,70
Témoin (sur pomme)	19,90 (15) 5,11	1,20 (5) 1,04	1,40 (7) 0,70	1,99 (5) 3,9

.../...

Tableau 3-b - Influence de la concentration en acide déhydro-ascorbique (DHASC) du milieu nutritif sur l'amino-acidémie des larves de *Laspereysia pomonella*. Les valeurs des moyennes sont accompagnées de celles des écarts-types (entre parenthèses) N = nombre de mesures. La colonne figurant à l'extrémité droite du tableau précise les valeurs mesurées chez des témoins recevant leur nourriture naturelle (pommes).

Conc. DHASC mM / Amino-ac.	Carence (N=3)	3,7 (1) (N=6)	3,7 (2) (N=4)	15 (N=3)	30 (N=5)	60 (N=5)	Témoins (N=9) nourris. sur pommes
Lysine	12,73 (0,90)	16,25 (2,26)	15,42 (2,28)	4,51 (1,03)	6,70 (4,34)	8,21 (1,26)	4,09 (0,78)
Arginine	14,97 (0,92)	13,06 (5,19)	6,18 (2,45)	3,08 (0,63)	6,06 (3,43)	6,30 (1,07)	2,60 (1,26)
Histidine	16,18 (2,25)	8,26 (1,72)	4,75 (0,57)	7,66 (0,78)	7,21 (0,61)	8,62 (2,10)	7,18 (1,52)
Ac. Aspartique	5,93 (2,01)	2,68 (1,48)	3,1 (0,32)	5,78 (2,23)	3,50 (2,67)	12,20 (2,26)	3,90 (1,79)
Sérine	10,43 (1,5)	16,30 (3,5)	13,0 (1,4)	8,09 (0,83)	9,15 (2,59)	15,43 (3,27)	5,72 (1,08)
Ac. Glutamique	14,68 (1,29)	13,66 (2,44)	9,69 (3,07)	10,29 (0,49)	11,90 (5,28)	16,78 (0,86)	10,72 (1,35)
x7	2,44 (0,93)	0,94 (0,55)	1,64 (0,22)	5,23 (2,78)	6,18 (2,82)	6,70 (3,72)	7,22 (1,87)
Thréonine	8,70 (2,25)	7,61 (0,61)	7,73 (1,75)	5,90 (2,23)	6,65 (3,04)	12,43 (2,15)	4,08 (1,19)
Alanine	5,66 (0,67)	3,18 (0,49)	3,33 (0,15)	2,39 (0,07)	3,03 (1,06)	2,96 (0,18)	2,69 (0,77)
Proline	2,72 (1,24)	9,63 (3,63)	6,57 (0,86)	3,28 (0,88)	7,51 (7,27)	1,81 (1,08)	1,19 (0,19)
Tryptophane + x8	2,45 (0,90)	4,72 (1,76)	4,33 (0,57)	1,83 (0,53)	3,97 (1,44)	2,66 (0,66)	0,35 (0,16) 1,68 (0,64)
Valine + Méthionine	7,23 (1,13)	2,29 (0,94) 1,51 (0,60)	11,09 (1,61)	3,62 (1,25)	5,21 (1,06)	4,23 (1,10)	2,14 (0,68) 0,55 (0,15)
Phényl-alanine	2,80 (0,66)	0,90 (0,29)	2,20 (1,05)	1,37 (0,39)	1,50 (0,81)	2,16 (0,53)	2,53 (1,28)
Iso-leucine	3,41 (0,53)	1,49 (0,79)	4,40 (0,64)	1,45 (0,39)	2,36 (0,74)	2,23 (0,44)	2,20 (0,71)
Leucine	3,11 (0,59)	1,81 (1,07)	5,53 (0,82)	1,35 (0,52)	2,10 (0,77)	2,40 (0,61)	1,25 (0,36)
Cystéine	1,36 (0,42)	1,12 —	—	1,07 (0,31)	1,63 (0,32)	1,82 (0,72)	1,41 (0,50)

.../...

Discussion

Le mode d'action de l'acide ASC sur la glycémie et l'amino-acidémie sera plus longuement discuté dans une publication en préparation sur ce sujet.

a) Les amino-acides.

On connait depuis quelques années le rôle possible de l'ASC dans le transport de certains amino-acides tels que : Arg, Thr, Try sous forme de dérivés N-Ascorbylés (ORILLARD 1973, *Fr. Demande*, 3 p.). Chez le cobaye, la carence en ASC entraîne également une forte augmentation de l'amino-acidémie (HORNIG *et al.* 1971, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 41, 86-89) et l'ASC pourrait agir sur certaines amino-acide-hydrolases (MILLER 1975, *Arch. Biochem. Biophys.*).

b) Les Glucides. Relation avec le Programme " Glycémie ".

En 1970, SJOSTRAND montrait certains effets adrénergiques de l'acide DHASC (*Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 356, 79 pp.), avec réduction de la teneur cervicale en Nor-adrénaline, chez la souris.

La parenté structurale entre l'ASC et le glucose a suggéré la possibilité d'un système commun de transport inter-membranaire. Le Glucose administré altère le transport de l'acide DHASC, tandis que l'Insuline entraîne une diminution de teneur en ASC du plasma (MANN 1974, *Fed. Proc.*, 33, 251).

Enfin, en 1975, une série de travaux est venu montrer les possibilités d'intéractions entre l'ASC et l'AMP cyclique (VAN WYK *et al.* 1975, *S. Afr. J. Sci.*, 71, 28-29 ; NATMANS 1975, *B.B.A.*, 399, 244-53 ; BUCK 1975, *B.B.A.*, 389, 251-260) et l'influence de l'ASC sur la glycogénolyse (SARKAR *et al.* 1975, *Indian Med. Gaz.*, 14, 489-493).

Il paraît donc très vraisemblable que l'inter-dépendance entre l'ASC et la Glycémie puisse faire appel chez l'Insecte, comme chez les Vertébrés, à l'intervention d'hormones du contrôle de la glycémie. Enfin, l'ASC et ses dérivés jouent à l'égard des α-glucosidases et des phosphatases un rôle dont l'étude, ébauchée au laboratoire en 1974-1975, mériterait peut-être d'être poursuivie un jour.

.../...

Deuxième Partie

Programme sur la Régulation de la Glycémie de l'Abeille et ses applications

Chap. I - ASPECTS ENZYMOLOGIQUES.

L'une des voies de contrôle de la glycémie de l'Abeille réside dans la rétro-inhibition des α-glucosidases par le glucose, dont le mécanisme est doué d'une grande souplesse, donnant lieu, en particulier à une inhibition mixte de type " n " (BOUNIAS 1977, *C.R. Acad. Sc.*, 285, 1263-1266).

I-1. Détermination rigoureuse des paramètres cinétiques.

Depuis 1974, en ce qui concerne l'Abeille, et antérieurement au cours de recherches en Biochimie végétales, s'imposait la nécessité de pouvoir déterminer de façon simple mais rigoureuse les 3 paramètres fondamentaux de l'équation de HILL :

$$V = \frac{V_M \cdot S^n}{K + S^n}$$, soit V_M, K et n.

Le principe de la méthode nouvelle a été proposé en 1977, et son application pratique a fait l'objet de deux publications : l'une dans *Comp. Biochem. Physiol.* (vol. 31A, 1979 sous presse) au sujet des α-glucosidases nymphales ; l'autre dans les *C.R. Soc. Biol.* (également sous presse) au sujet de la Phosphatase alcaline intestinale. Ces applications ont permis d'éprouver la fiabilité de la technique, et dans de nombreux cas, sa supériorité par rapport à la seule autre méthode algébrique connue (ENDRENYI *et al.* 1975, *Eur. J. Biochem.*, 51, 317-328). Par suite, toutes les mesures cinétiques effectuées de 1974 à 1977 ont été recalculées, et l'acuité accrue des résultats a permis d'élaborer les bases d'une hypothèse permettant de rendre compte de l'inhibition de type n, en assignant une signification physiologique à l'équation de HILL.

a) Programme de calcul sur carte magnétique.

La détermination des paramètres résulte des équations suivantes :
Etant donnée la vitesse de réaction V_1 mesurée pour la concentration en substrat S_1 = 1 unité ($1^n = 1$: V est indépendant de n), et les vitesses respectives V_p et V_q correspondant aux concentrations en substrat p et q, deux possibilités sont offertes :

.../...

Tableau 4

Programme de résolution du calcul de V_M (sur HP 65)

Introduction des données :

1er cas : pq = 1 : Vp en A ; V1 en B ; Vq en C

2e cas : $p = p^2$: V1 en A ; Vp en B ; Vq en C

La touche D entraîne l'affichage de V_M.

N° Pas	Touche
01	LBL
02	A
03	g
04	1/x
05	STO
06	1
07	LBL
08	B
09	g
10	1/x
11	STO
12	2
13	LBL
14	C
15	g
16	1/x
17	STO
18	3
19	LBL
20	D
21	RCL

N° Pas	Touche
22	2
23	2
24	x
25	RCL
26	1
27	RCL
28	3
29	+
30	-
31	RCL
32	2
33	ENT
34	x
35	RCL
36	1
37	RCL
38	3
39	x
40	-
41	$\frac{o}{o}$
42	RTN

.../...

- quand $p.q = 1$: $V_M = \dfrac{\frac{2}{V_1} - \left(\frac{1}{V_p} + \frac{1}{V_q}\right)}{\frac{1}{V_1^2} - \frac{1}{V_p \cdot V_q}}$

- quand $q = p^2$: $V_M = \dfrac{\frac{2}{V_p} - \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_q}\right)}{\frac{1}{V_p^2} - \frac{1}{V_1 \cdot V_q}}$

Par suite : $K = \dfrac{V_M}{V_1} - 1$ et $n = \dfrac{\text{Log } (K.V_i) - \text{Log } (V_M - V_i)}{\text{Log } S_i}$

(pour chaque valeur V_M) ($\forall (V_i, S_i)$.)

Ces équations ont été transcrites sous forme de programmes pré-enregistrés sur cartes magnétiques (calculatrice Hewlett-Packard HP 65) selon les principes indiqués dans les tableaux 4 et 5. Une nouvelle transcription sera réalisée ultérieurement pour la calculatrice Texas Instruments TI-59 acquise par le laboratoire.

b) Les α-glucosidases nymphales.

Les résultats résumés ci-dessous montrent, à 3 stades successifs, la comparaison du calcul selon 4 méthodes : la " droite " de Lineweaver Burk suivie de l'application de l'équation de HILL pour n et K, l'amélioration empirique décrite en 1977 et 1978 (*Rapp. Ann.* 1977 et *Comp. Biochem.* 1978), la méthode rigoureuse décrite ici, et enfin la méthode d'Endrenyi.

-Nymphes au 1er stade (No) (fig. 2-a)

Méthode	V_M nmoles/mn/µl			K mM			n		
	$\bar{x}$	(N)	σ_x	$\bar{x}$	(N)	σ_x	$\bar{x}$	(N)	σ_x
Lineweaver B.	0,40			1,067			1,058		
puis HILL	épreuve linéar. négat.						(Méth. HILL)		
Amélior. Empirique	0,601	(4)	0,04	2,14	(4)	0,24	0,705	(4)	0,045
Méth. Alg. M.B.	0,69	(6)	0,10	2,71	(6)	0,56	0,633	(7)	0,066
Méth. Endrenyi (sauf K, selon M.B.)	0,68	(3)	0,10	2,67	(7)	0,13	0,655	(3)	0,014

-Nymphes au 3e stade (N3) (fig. 2-b)

Lineweaver B.	3,81			2,940			1,016		
							(Méth. HILL)		
Amélior. Empirique	3,69	(4)	0,051	2,81	(4)	0,06	1,067	(4)	0,027
Méth. Alg. M.B.	3,81	(7)	0,20	2,96	(7)	0,21	1,003	(9)	0,040
Méth. Endrenyi (sauf K, selon M.B.)	3,59	(3)	0,20*	2,47	(9)	0,32*	1,008	(3)	0,039*

* Ces valeurs de σ_x sont d'origine algébrique et non biologique.

.../...

-Nymphes au 6e stade (N6) (fig. 2-c)

	V_M			K			n		
Lineweaver B.	1,63			7,50			0,818		
+ HILL	épreuve linéar. négat.								
Amélior. Empirique	1,001	(4)	0,015	4,31	(4)	0,06	1,21	(4)	0,032
Méth. M.B.	0,948	(5)	0,013	4,15	(5)	0,074	1,36	(5)	0,076
Méth. Endrenyi (+ K selon M.B.)	0,944	(3)	0,010	4,51	(8)	0,51	1,39	(3)	0,021

c) La Phosphatase alcaline de l'intestin d'Abeille.

Caractérisée chez la race noire (*Mellifica*), la molécule se présente chez les Butineuses sous forme d'une fraction principale, de P.M. voisin de 120 000 (fig. 3) déterminé par électrophorèse en gel d'acrylamide, puis incubation des fractions découpées transversalement dans le substrat utilisé pour les mesures cinétiques (p.NPP).

La régression de V^{-1} sur S^{-1} conduit à une épreuve de linéarité négative (fig. 4-a et b). Les mesures V = f(S) effectuées à 3 ans d'intervalle (1974 et 1977) ont été traitées selon les équations algébriques rigoureuses, ce qui a conduit aux résultats suivants :

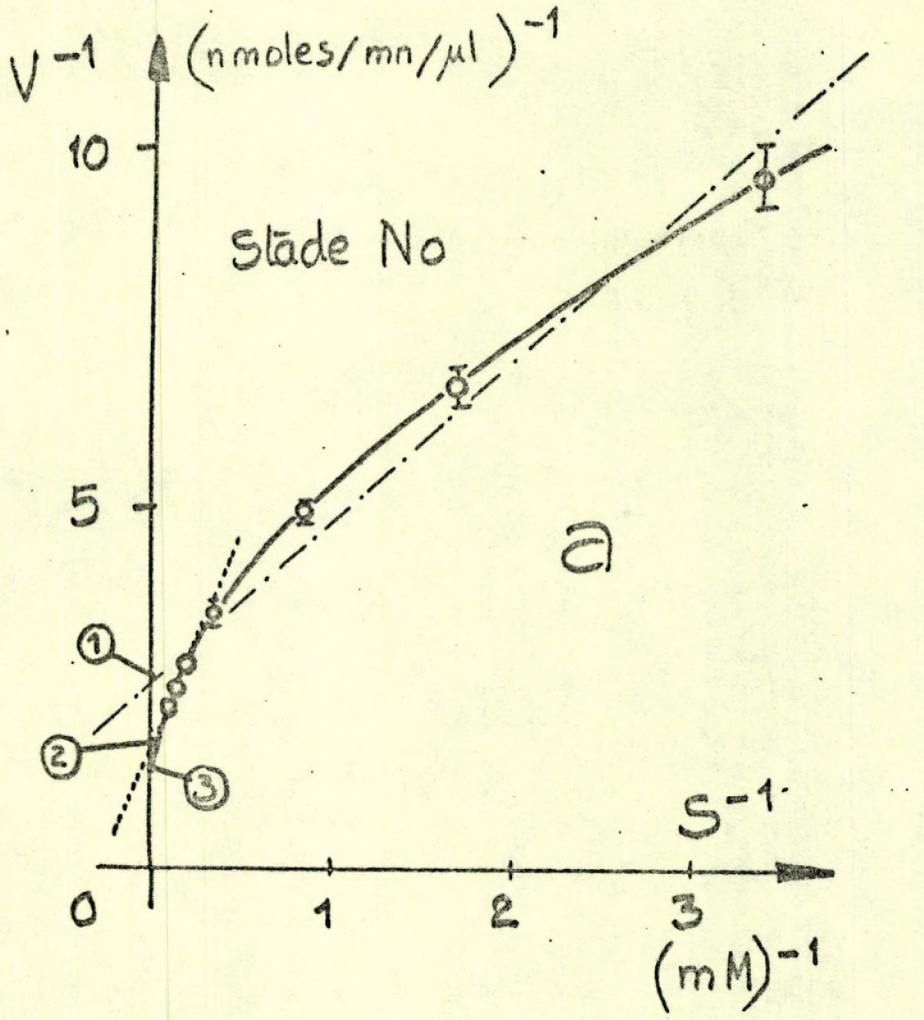
colonie de 1974 : V_M = 5,81 nmoles/mn/intestin (N = 3) σ_x = 0,48
K = 6,10 mM (3) 0,58
n = 0,621 (6) 0,013

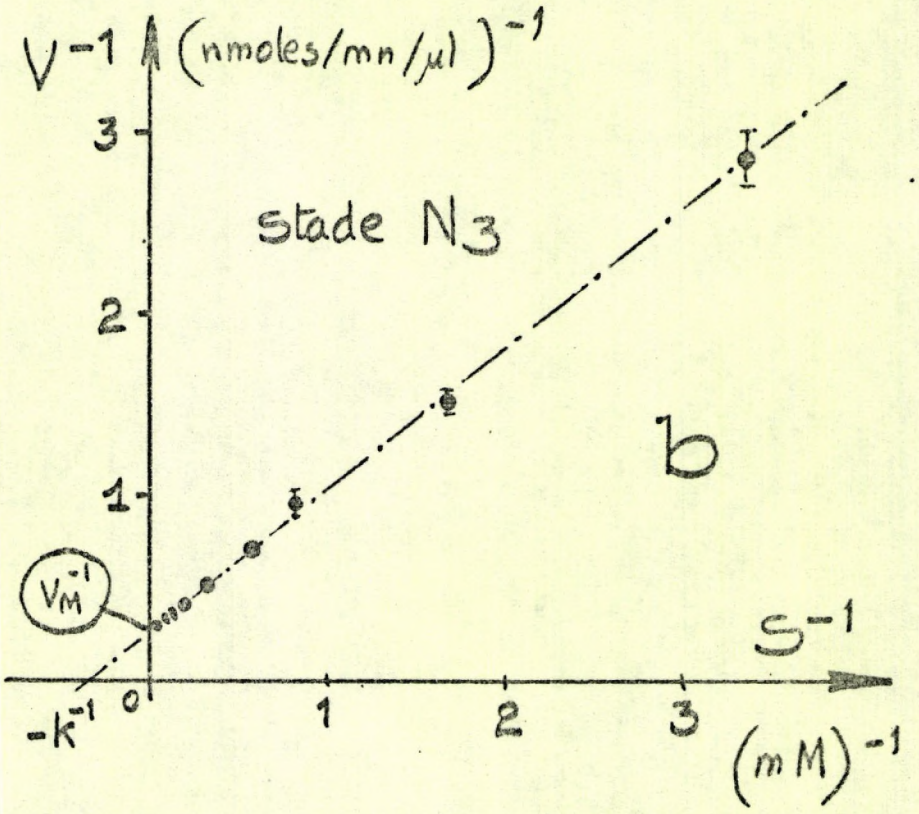
colonie de 1977 : V_M = 5,86 (6) 0,27
K = 8,50 (6) 0,022
n = 0,600 (10) 0,022.

La méthode d'ENDRENYI *et al.* appliquée au 2e cas a donné les déterminations suivantes : $\overline{V}_M$ = 5,76 et $\overline{n}$ = 0,593 (N = 3).

Les diverses séries de mesures montrent une excellente concordance et soulignent la stabilité des paramètres au sein d'une même race. Seule varie la valeur de K : la comparaison des moyennes de 1974 et 1978 donne t = 6,23 (t 5 % = 2,36).

.../...





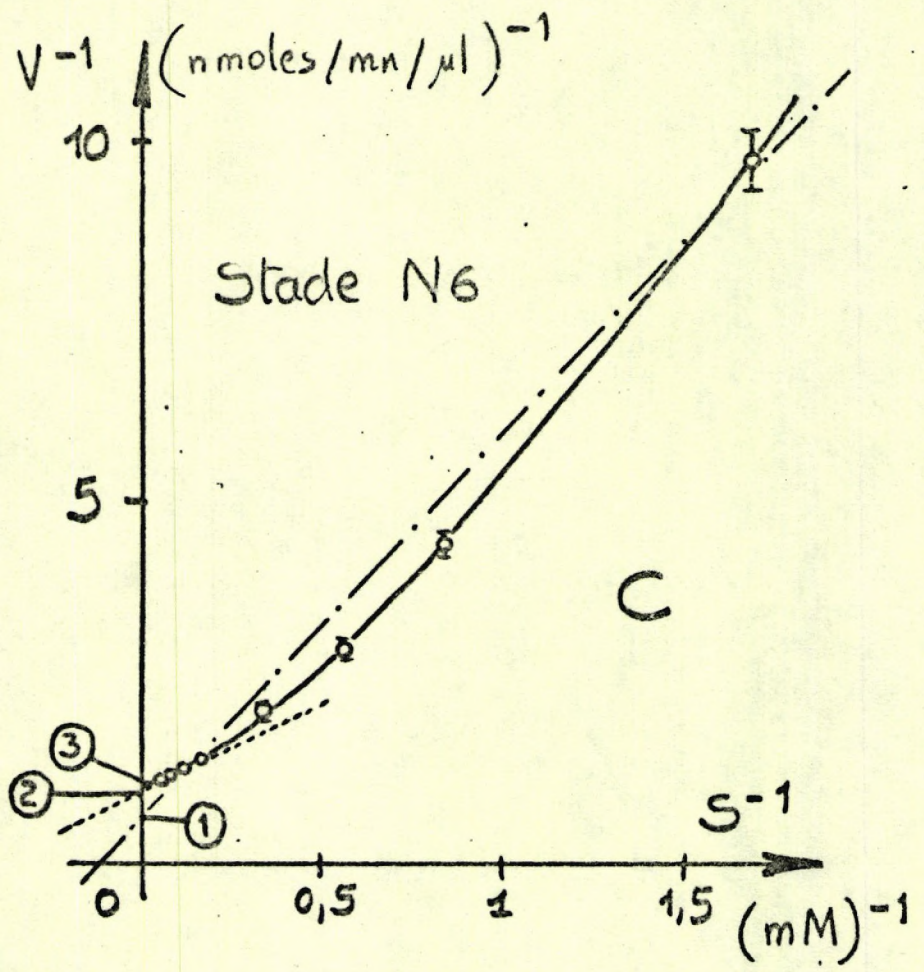


Fig. 2 - Etude des relations V^{-1}/S^{-1} chez les α-glucosidases de l'hémolymphe à 3 stades nymphaux de l'Abeille. (N = 3 à 4 mesures par point)

(—.—.—) Droites de régression ; (——) courbes réelles -

① : V_M^{-1} obtenu par extrapolation de la droite de Lineweaver-Burk

② : V_M^{-1} " " " des points tels que $V \geq 0,75\ V_M$

③ : V_M^{-1} " par les équations algébriques

.../...

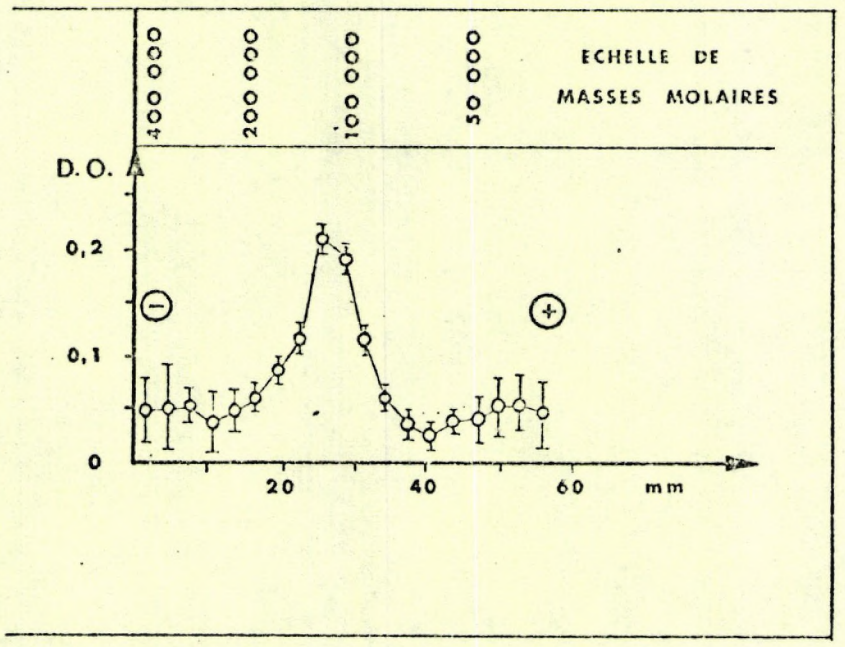


Fig. 3. Phosphatase alcaline intestinale de l'Abeille. Electrophorèse sur gel d'acrylamide suivie de découpage transversal et incubation dans le p.N.P.P. (Ab. Butineuses)

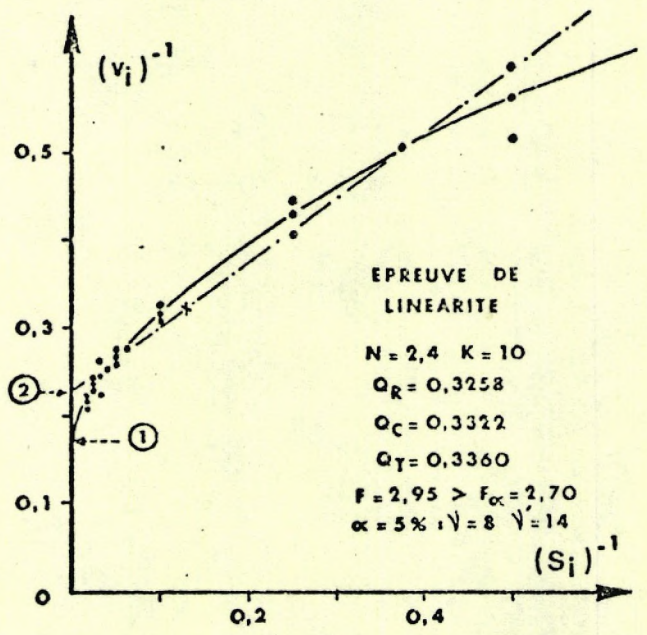


Fig. 4 a

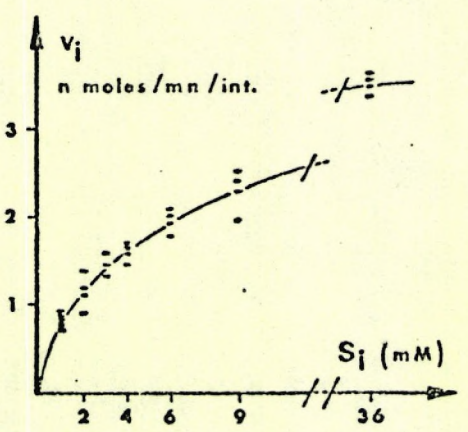


Fig. 4 b.

Phosphatase alcaline de l'intestin d'Abeilles (Butineuses)

a) Courbe V^{-1}/S^{-1} : colonie 1977

b) Courbe directe V/S : colonie 1974

.../...

I-2. Relations entre la Glycémie et les α-Glucosidases.

Les paramètres V_M, K et n ont été calculés de 1974 à 1976 sur 2 colonies de même race (avec mesure de la glycémie à partir des mêmes extraits) à tous les stades du développement.

a) Bilan de l'action du Glucose *in vitro*.

Le rôle du glucose *in vitro* a été déterminé par action sur les cinétiques dans les deux cas : V = f(S) avec et sans inhibiteur (I = Glucose) et V = f(I), pour une valeur de S fixe, voisine de Ko.

Les bilans des premiers résultats obtenus sont résumés sur la fig. 5.

Ces données ont été obtenues au moyen d'une méthode de calcul améliorée par voie empirique (BOUNIAS 1977, *Rapp. Annuel 6*, page 4) : elles sont en cours de révision compte tenu de la nouvelle méthode rigoureuse de calcul, ce qui permettra d'affiner l'interprétation physiologique des résultats, et particulièrement les corrélations exposées au chapitre suivant.

b) Relations entre Vitesse maximale et Glycémie.

La vitesse maximale est liée à la Tréhalosémie selon une relation hyperbolique. Le calcul de régression en coordonnées semi inversées (N = 10 couples), illustré par la fig. 6-a, donne : corrélation : ρ = 0,822 et $I = 28{,}4\ V_M^{-1} + 15{,}6$.

Une étude plus détaillée montre cependant que ce phénomène global se décompose différemment stade par stade, de telle sorte que les corrélations y sont alors directes (fig. 6-b). L'analyse de chacune des corrélations particulières donne les résultats ci-dessous :

	corrélation	V_M = f(Tréhalosémie)	
Stades :	ρ (N)	pente (b)	ord. à l'orig. (a)
L5	0,989 (16)	0,0234	- 0,75
No	0,988 (26)	0,0298	0,162
N2	0,940 (19)	0,1095	0,782
Naissantes	0,650 (15)	0,0076	0,455
Butineuses	0,987 (29)	0,126	6,44

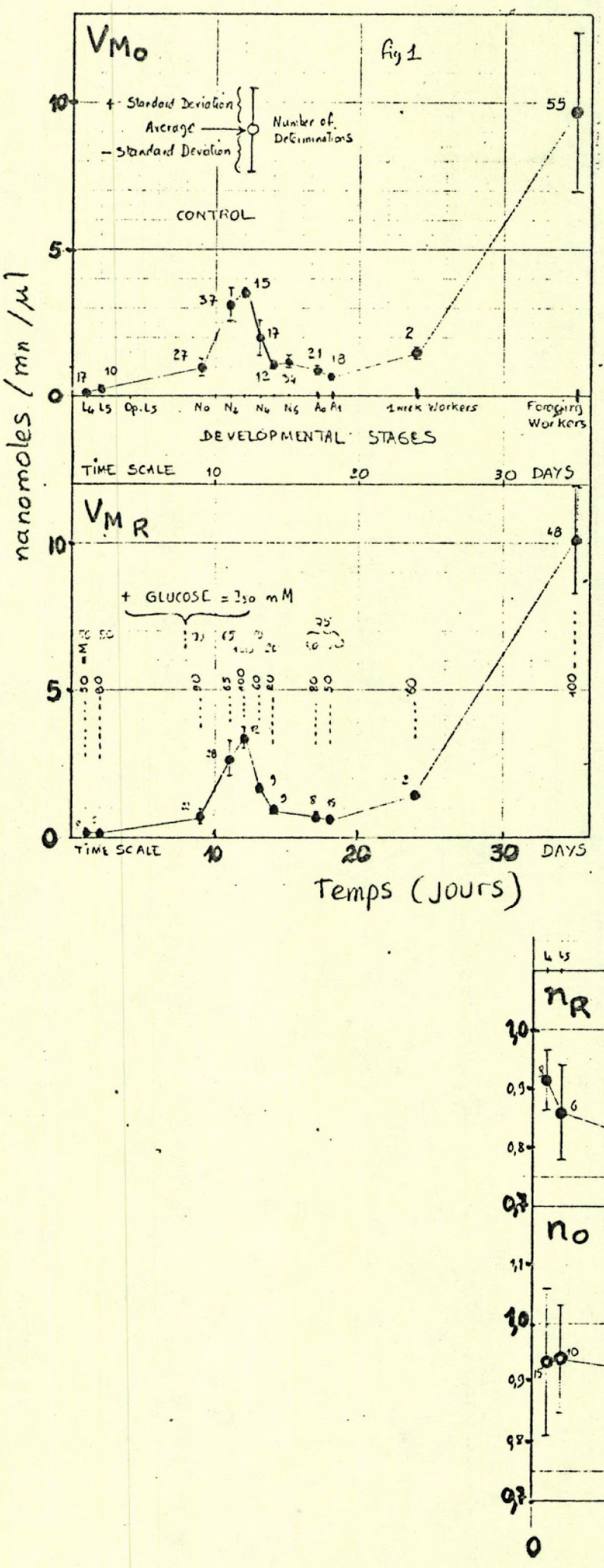
Pour chaque stade pris isolément, ces relations sont compatibles avec une induction par le substrat, tandis que d'un bout à l'autre du développement, les propriétés de la molécule doivent plutôt s'adapter à l'évolution de la glucosémie naturelle, (Cf. BOUNIAS 1978, *Comp. Biochem. Physiol.*, 61, 13-18) comme le suggère la figure (6-d).

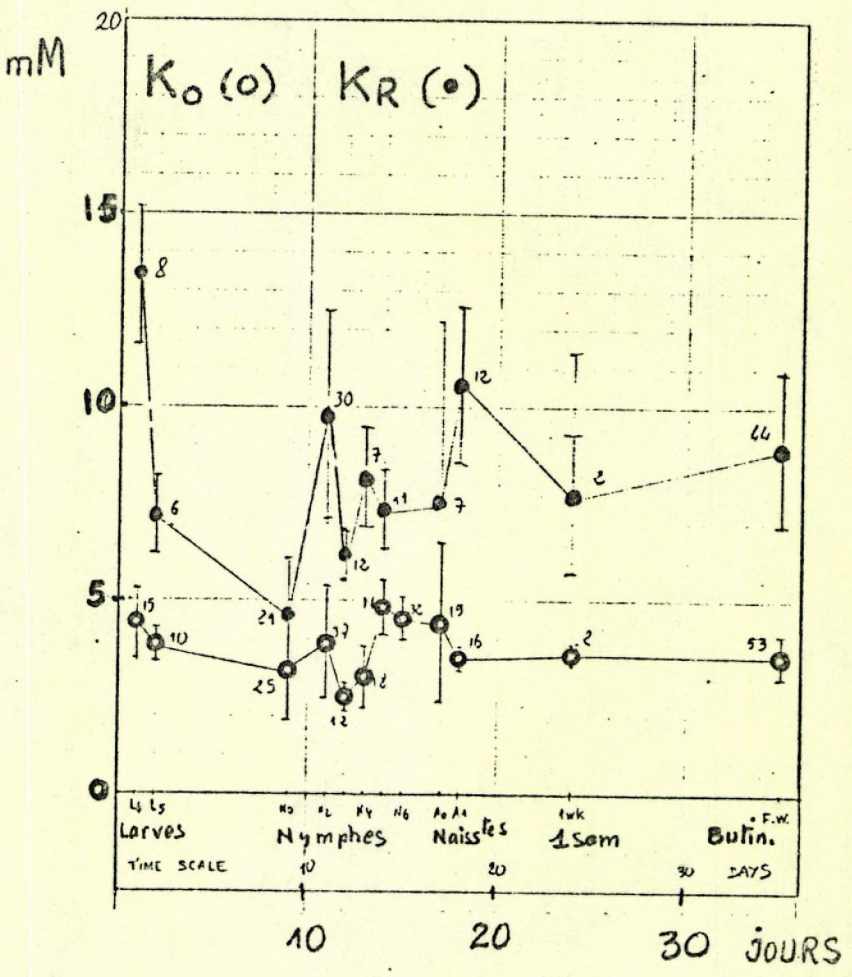
c) Relations entre constantes d'affinité et glycémie.

La constante d'affinité résultante est corrélée à la glycémie initiale à certains stades selon les paramètres suivants (fig. 7-a et b) :

Stades	ρ (N)	pente (b)	ord. à l'orig. (a)	a/b
No	0,70 (7)	0,043	1,975	45,9
N2	0,92 (7)	0,14	1,92	13,7
Naissantes	0,93 (7)	0,15	2,25	15,0
Butineuses	0,987 (4)	0,041	3,16	77,45

.../...





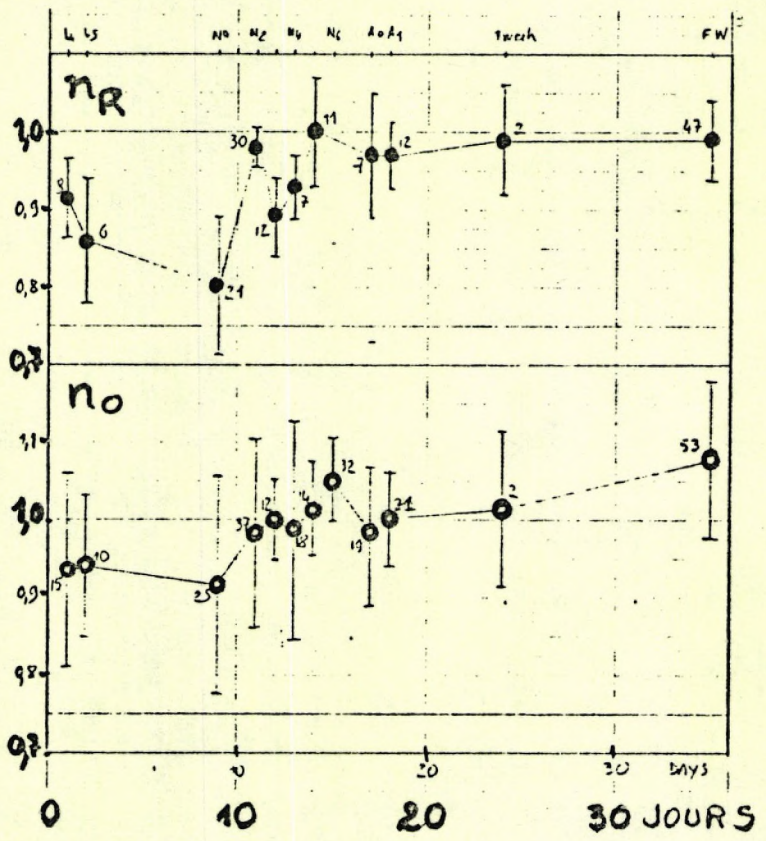
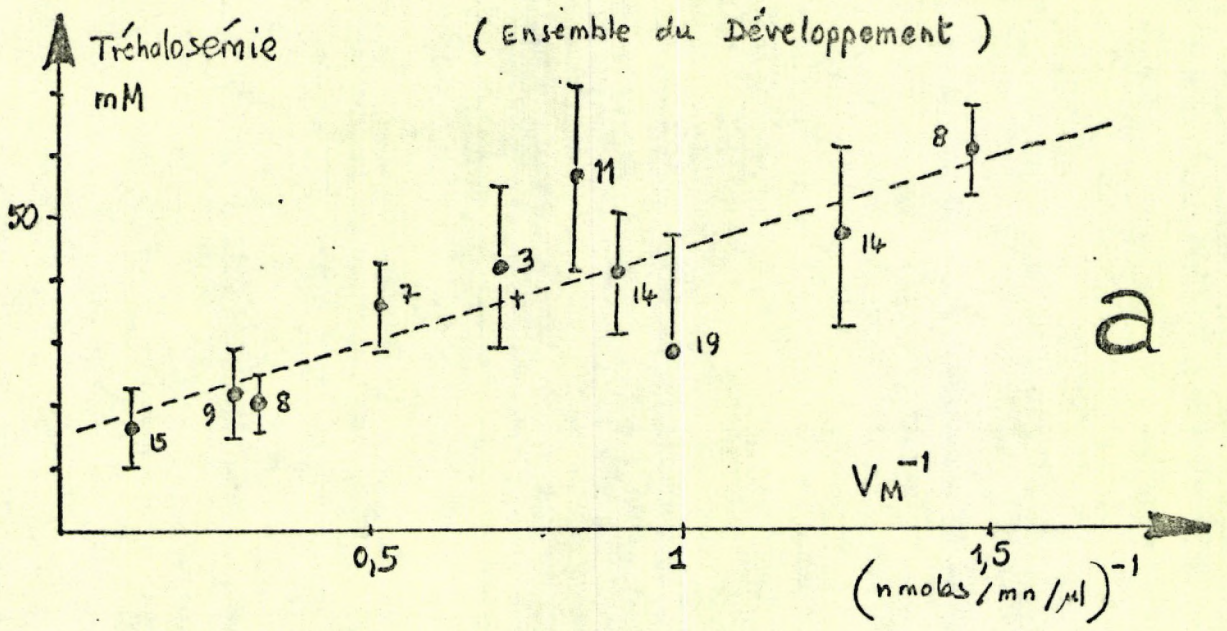
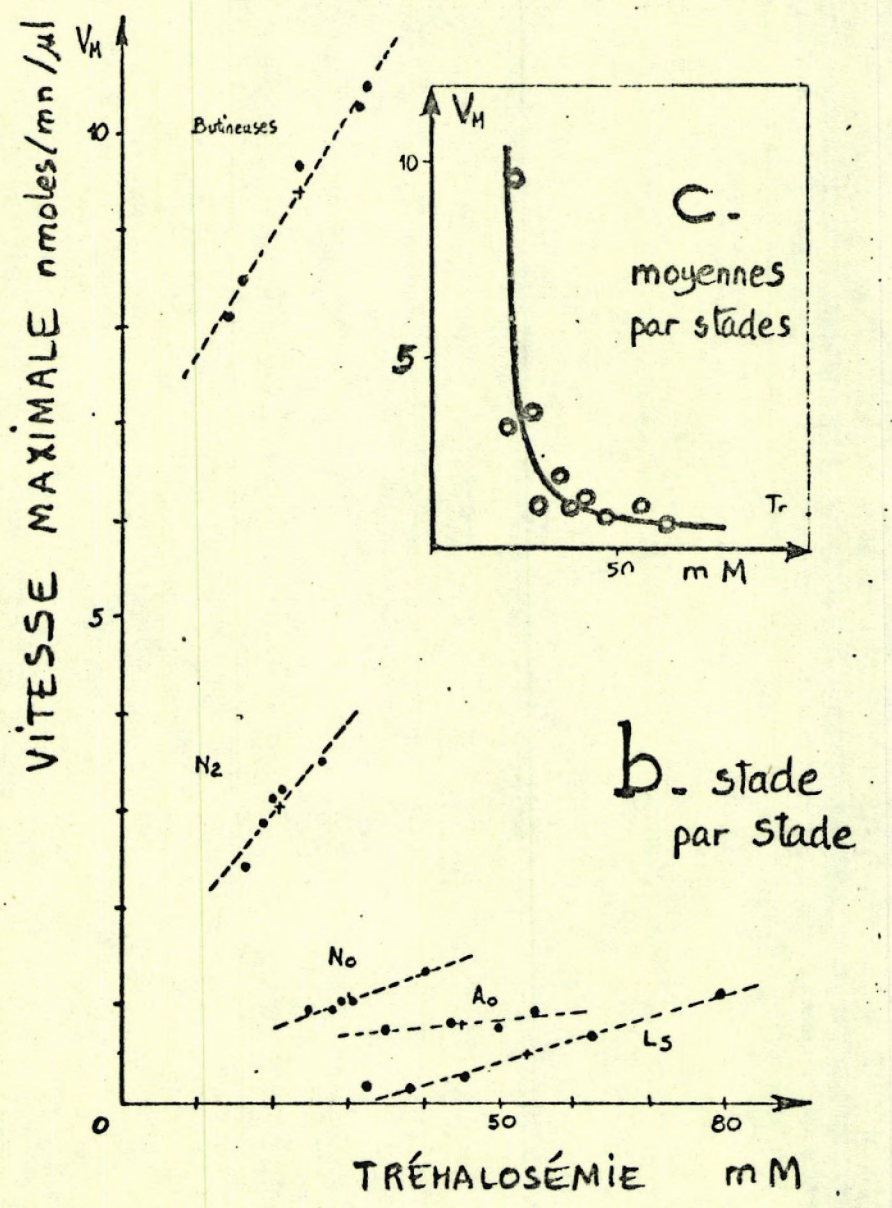


Fig. 5 . Modifications des paramètres V_M, K et n de l'α-glucosidase de l'hémolymphe sous l'action du glucose in vitro , à divers stades du dévelop-pement.

.../...





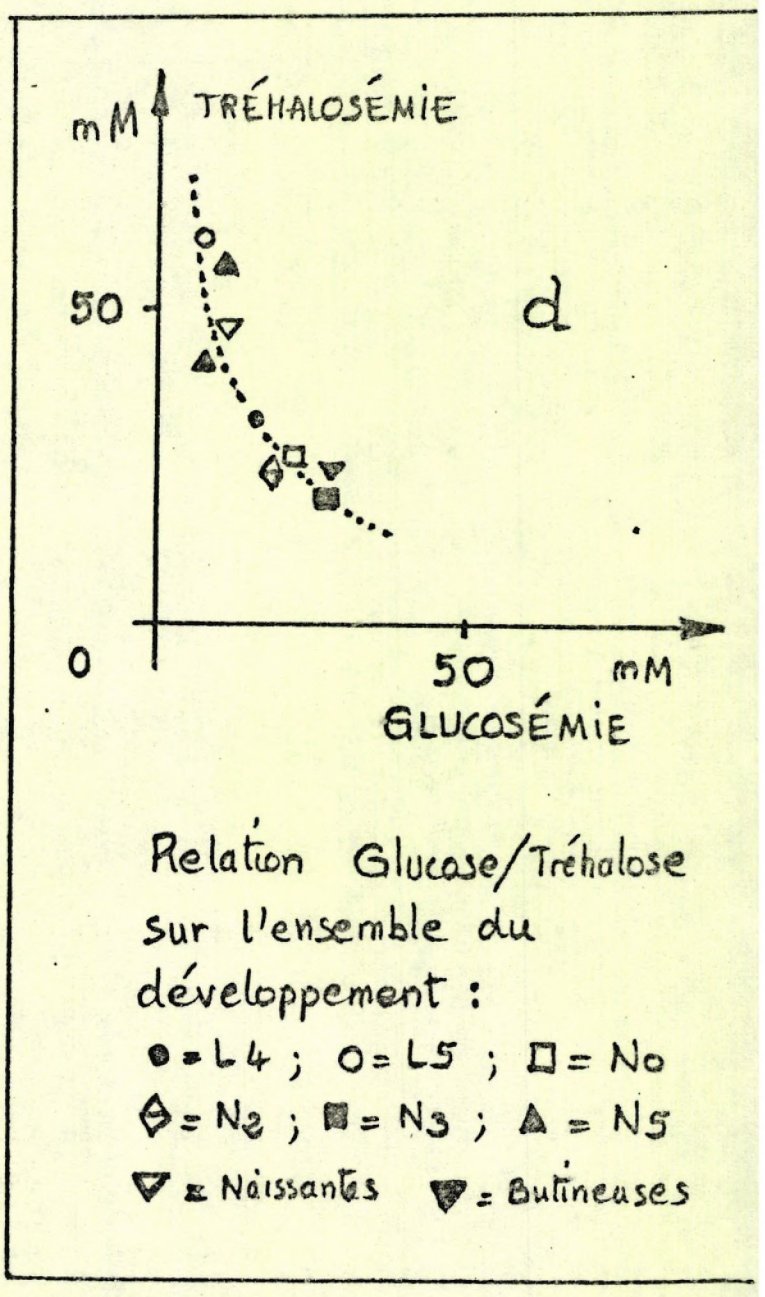


fig. 6. Relations entre la vitesse maximale d'activité de l'α-glucosidase de l'hémolymphe et la Tréhalosémie.

.../...

Ceci confirme *in vivo* la relation : $K_R = \frac{Ko}{Ki} . Go + Ko$, établie précédemment chez les naissantes (BOUNIAS 1977, *C.R. Acad. Sc.*, 285, 261-264). Les valeurs $Ki = \frac{a}{b}$ obtenues sont plausibles.

Chez les Nymphes No, il se dégage nettement une corrélation négative entre K_R et la tréhalosémie : $\rho = -0,905$ (N=6) b = -0,092 a = 5,74 qui confirme les relations précédemment établies entre Tréhalosémie et Glucosémie.

Chez les Adultes, cependant, il apparaît assez nettement que la régression obtenue ici après apport de Glucose *in vitro*, n'est pas forcément linéaire : la nature de la relation sera précisée à l'issue des calculs de vérification des paramètres selon les nouvelles équations.

Les variations de la valeur de K_R en fonction de la glucosémie peuvent se traduire dans le cas le plus simple de la façon suivante :

$K_R/Témoin = \frac{Ko}{Ki} Go + Ko$ Go = Glycémie naturelle initiale

$K_R/Glucose = \frac{Ko}{Ki} (Go + G_i) + Ko$ G_i = Glucose ajouté *in vitro*

d'où :

$$R_K = \frac{K_R/Glucose}{K_R/Témoin} = \frac{G_i}{Go + K_i} + 1$$

Les courbes expérimentales illustrent assez bien cette relation aux stades N2 et adultes naissantes (Ao), comme l'indiquent les fig. 7-c à 7-d, en coordonnées directes et inverses, soit :

$$(\frac{K_R/G}{K_R/T} - 1)^{-1} = \frac{Go}{Gi} + \frac{K_i}{G_i}$$

Les régressions linéaires donnent respectivement :
stade N2 : $\rho = 0,812$ (5 couples) b = 0,0253 a = 0,283 soit $K_i = 14,24$
stade Ao : $\rho = 0,793$ (8 couples) b = 0,0258 a = 0,468 soit $K_i = 21,60$

Ces valeurs s'accordent avec les résultats antérieurs.

d) Relations entre le coefficient de HILL et la glycémie.

Le coefficient de HILL est lié à la glycémie de manière caractéristique aux stades (L4 à N2) et (N3 à Ao) (fig. 8)
Dans le 1er cas : $\rho = -0,77$ (9) b = -0,0017 a = 1,043
Dans le 2e cas : $\rho = -0,83$ (13) b = -0,0060 a = 1,029
Chez les Butineuses : $\rho = 0,075$ (6) b = 0,00005 a = 1,071.

Le coefficient de HILL subit la loi de l'inhibition de type n jusqu'au stade abeilles naissantes (Ao) tandis qu'il se stabilise à une valeur supérieure à 1, sans corrélation significative avec la glycémie, chez les butineuses.

Sans préjuger des améliorations de précision qu'apporteront les nouvelles déterminations algébriques des paramètres, ces résultats caractérisent déjà clairement les grandes lignes de l'inter-dépendance de l'activité α-glucosidasique et de la glycémie naturelle.

Sur ce dernier point, l'étude des données numériques mérite d'être approfondie. Ainsi, plus que le coefficient n_T naturel pris isolément, ses variations sous l'action du glucose *in vitro* (caractérisées par le rapport $\frac{nG}{nT}$) présentent un intérêt particulier illustré par la fig. 9-a et b et confirment leurs relations plus

.../...

évidentes avec la glucosémie qu'avec la tréhalosémie.

Celà nous ramène à l'étude de la relation $n_R = f(n_o, I)$ dans laquelle I = Glucosémie. L'étude de cette relation, plus développée dans les § suivants, pourra trouver ici une voie de-contrôle expérimental ; connaissant $n_o = f(G_o)$ et $n_i = f(I)$, le rapport $\frac{nG}{nT}$ équivalent à $\frac{n_i}{n_o}$ pourra être comparé aux données expérimentales. (fig. 9)

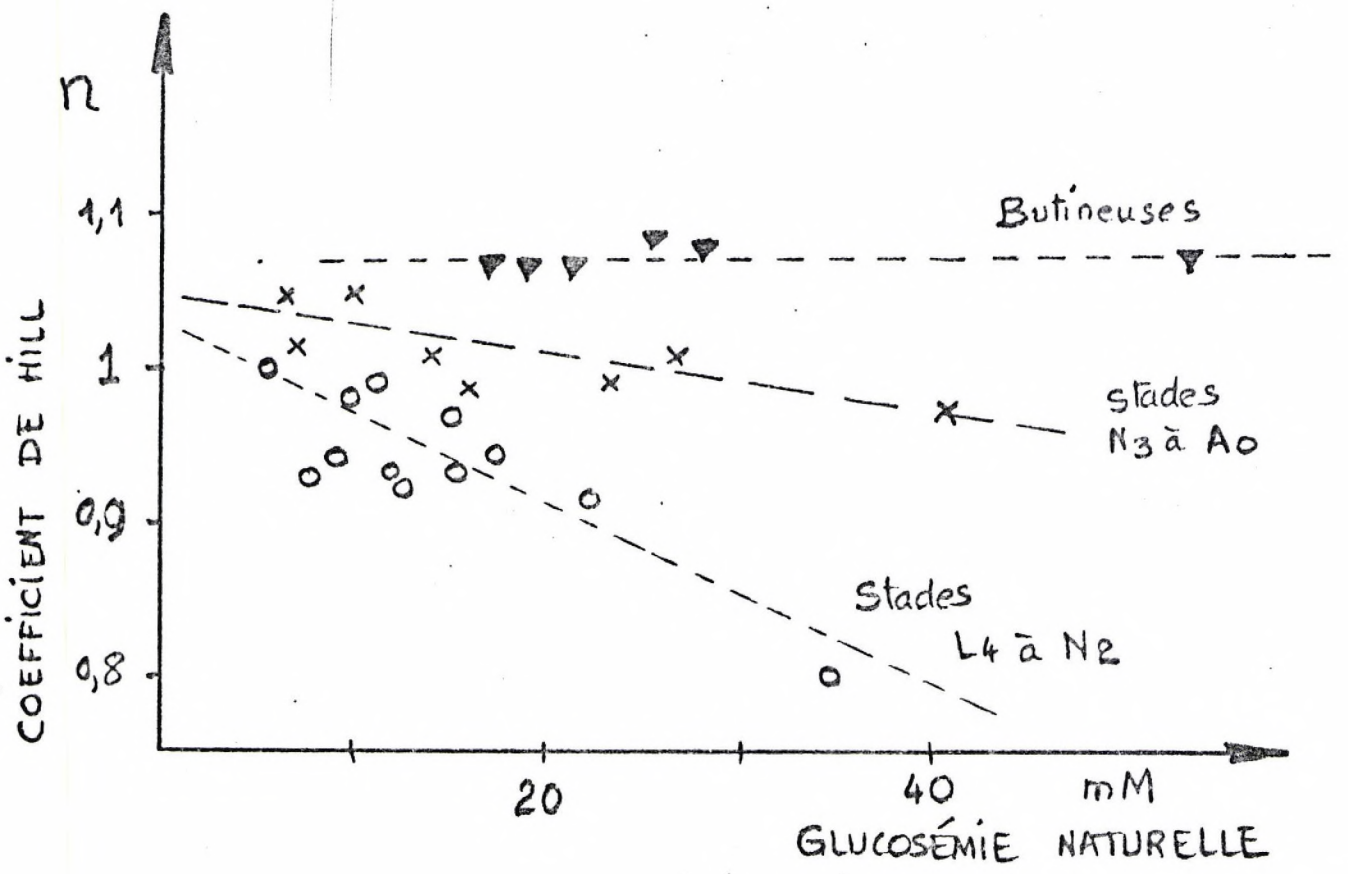


Fig. 8. Relation entre le coefficient de HILL de l'α-glucosidase de l'hémolymphe et la glycémie à divers stades.

Signification des écarts par rapport à 1 * :

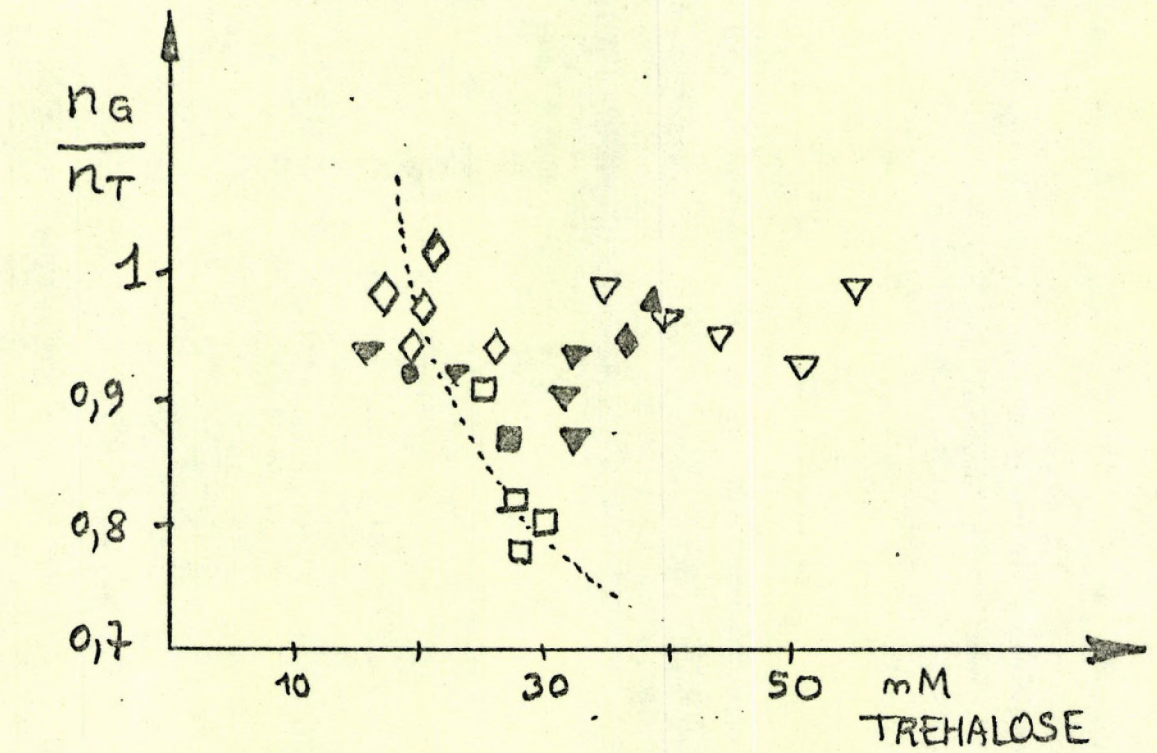
Butineuses : $\bar{n} = 1,080$ (N=53) $\Delta x = 0,099$
$\varepsilon = 0,027$: limite inf^{re} = 1,050 *

stade N_6 : $\bar{n} = 1,050$ (N=32) $\Delta x = 0,102$
$\varepsilon = 0,036$: limite inf^{re} = 1,014 *

Stade No : $\bar{n} = 0,917$ (N=25) $\Delta x = 0,144$
$\varepsilon = 0,059$: limite sup^{re} = 0,976 *

(* Ecarts accrus lors des calculs (inédits) par les équations rigoureuses)

.../...



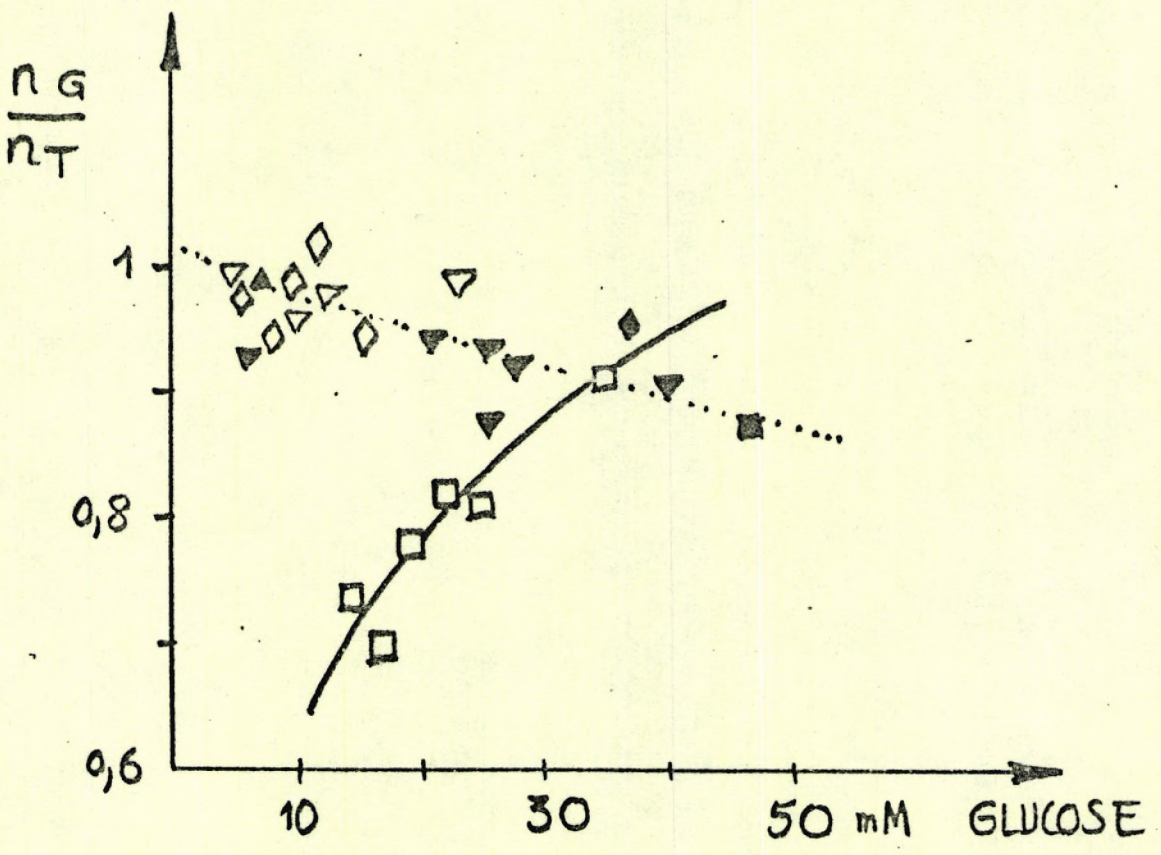


Fig. 9. Amplitude des modifications du coefficient de HILL de l'α-glucosidase de l'hémolymphe d'Abeille sous l'action du Glucose ajouté in vitro ($I \simeq I_{50}$) en fonction de la glucosémie initiale (G_o) et de la Tréhalosémie initiale (T_o).

Légende des signes : ● = L_4 ; ○ = L_5 ; □ = N_o ; ◇ = N_2 ; ■ = N_3 ; ◆ = N_4 ; ▲ = N_5 ; ▽ = A_o ; ▽ = A_7 (Ab. de 1 semaine) ; ▼ = Ab (Butineuses : 1 mois)

.../...

I-3. Etude du mécanisme moléculaire d'inhibition de l'α-glucosidase par le Glucose.

Il s'agit, à terme, d'établir la relation théorique $n_R = f(n_o)$, et de comprendre par quel mécanisme le coefficient de HILL peut passer de valeurs < 1 à des valeurs > 1.

Plusieurs voies expérimentales d'approche sont en cours.

a) Variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en inhibiteur *in vitro*.

Les courbes V = f(I) établies à chaque stade du développement nécessitent une analyse plus détaillée.

Dans le cas d'un mécanisme compétitif tel que n_i molécules de I peuvent entrer en compétition avec le substrat par molécule d'enzyme, si l'on appelle I_{50} la concentration de glucose conduisant *in vitro* à $V_i = \frac{V_o}{2}$, il apparaît :

$$V_o = \frac{V_M \cdot S^{n_o}}{K_o + S^{n_o}}$$

$$V_R = \frac{V_M \cdot S^{n_R}}{K_o \left(1 + \frac{I^{n_i}}{K_i}\right) + S^{n_R}} \qquad \text{et} \qquad \frac{V_o}{2} = \frac{V_M \cdot S^{n_{50}}}{K_o \left(1 + \frac{I_{50}^{n_i}}{K_i}\right) + S^{n_{50}}}$$

Si $n_R = n_o$, ces 3 équations se réduisent à :

$$\frac{V_o}{V_R} - 1 = \left(\frac{I}{I_{50}}\right)^{n_i}$$

Cette équation, toutefois, a déjà été publiée (CHOU 1976, *J. Théor. Biol.*, *59*, 253-276) sur la base de mécanismes compétitifs purs appliqués au cas " Michaëlien " ($n_o = 1$) pour le substrat.

Les courbes expérimentales $V_R = f(I)$ (la fig. 10-a illustre le stade N3 où $n_o = 1$: BOUNIAS 1979, *Comp. Biochem.* sous presse) ont été établies à tous les stades du développement, et transformées en coordonnées logarithmiques :

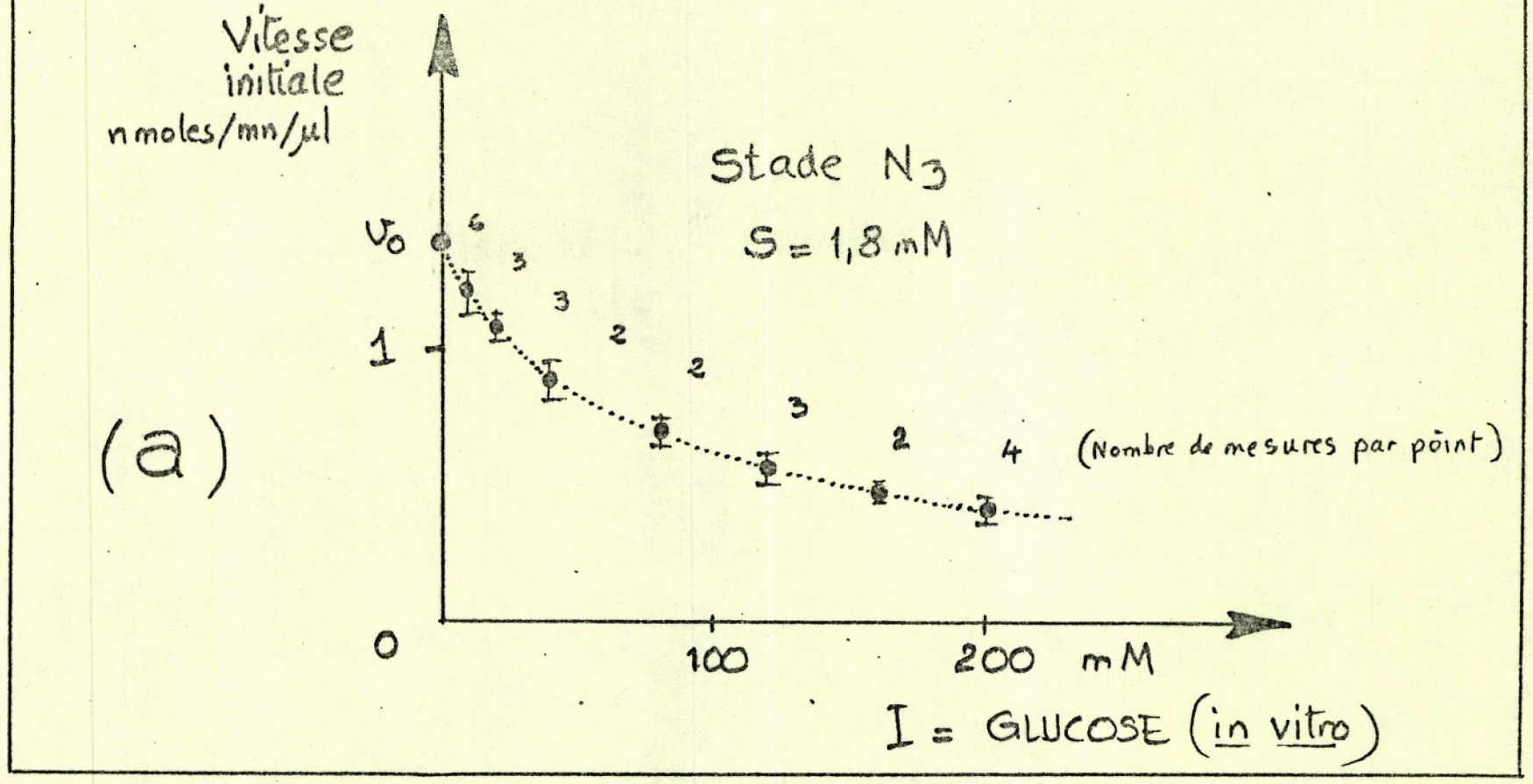
$$L_N \left(\frac{V_o}{V_R} - 1\right) = n_i \, L_N (I) - n_i \, L_N (I_{50})$$

Les droites de régression conduisent en principe à la détermination expérimentale de n_i et de I_{50} (illustration fig. 10-b pour le stade N3), et les résultats suivants ont ainsi été obtenus sur l'ensemble du développement :

Tableau

Stades	Colonie 635		Colonie 767	
	n_i	I_{50} (mM)	n_i	I_{50} (mM)
L4	0,77	56,7	—	—
L5	—	—	1,02	83,1
No	1,11	83,6	1,073	64,3

.../...



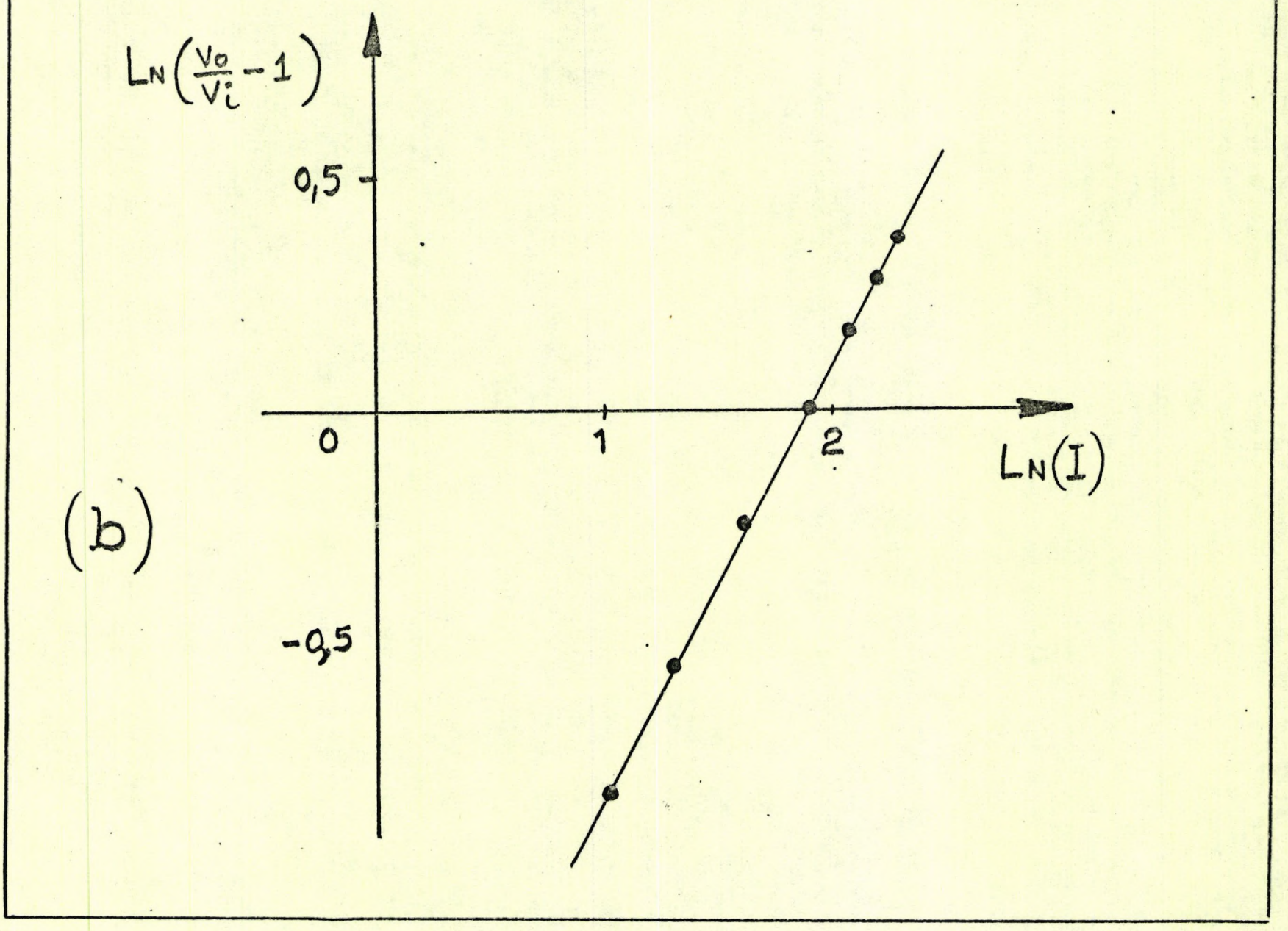


Fig. 10 - Relation entre la vitesse de réaction de l'α-glucosidase de l'hémolymphe et la concentration en inhibiteur in vitro : (a) courbe directe.
(b) Courbe logarithmique (Stade N3, tel que $n \simeq 1$)

.../...

Stades	Colonie 635		Colonie 767	
	n_i	I_{50} (mM)	n_i	I_{50} (mM)
N2	0,956	51,3	1,28	65,90
N3	—	—	0,95	77,4
N4-5	—	—	0,85	87,0
N5-6	1,095	78,7	1,122	73,6
Naissantes	1,318	70,4	0,773	58,6
Butineuses	0,90	99,1	1,12	120,5

Cependant, ces résultats préliminaires, confrontés aux déterminations de (n_o ; n_R), (K_o ; K_R), (V_{M_o} ; V_{M_R}) mesurées en présence de I = 0 et de I = I_{50}, ne s'avèrent que partiellement concordants.

En effet, que nous soyions en présence d'un mécanisme à prédominance de type K ne fait pas de doute (fig. 7) mais s'il est vrai que l'influence du type V peut être liée à un phénomène d'induction (en cours d'étude) plutôt que de cinétique propre à la molécule, il reste l'effet de " modulation " apporté par l'effet que nous avons dû qualifier de " type n " !

En 1978, l'étude de la relation $\frac{V_o}{V_R} = f(I)$ a été poursuivie avec, pour objectif, le cas plus général d'un mécanisme mixte (type V/K et $n_R \neq n_o \neq 1$). Le calcul se présente sous un aspect inextricable, pris globalement, mais une approche est en cours, à partir des cas particuliers pris isolément pour commencer.

Ainsi, le cas général s'écrit :

$$V_o = \frac{V_{M_o} \cdot S^{n_o}}{K_o + S^{n_o}} \qquad V_R = \frac{\dfrac{V_{M_o}}{1 + \dfrac{I^{n'_i}}{K'_i}} \cdot S^{n_R}}{K_o \left(1 + \dfrac{I^{n_i}}{K_i}\right) + S^{n_R}}$$

et pour $I = I_{50}$: $V = \frac{V_o}{2}$ soit :

$$\frac{V_o}{2} = \frac{\dfrac{V_{M_o}}{1 + \dfrac{I_{50}^{n'_i}}{K'_i}} \cdot S^{n_{50}}}{K_o \left(1 + \dfrac{I_{50}^{n_i}}{K_i}\right) + S^{n_{50}}}$$

Le cas non compétitif ou type V ($K_i \rightarrow \infty$) considéré à l'état pur avec $n_R = n_o$, conduit à : $I_{50}^{n'_i} = K'_i$ (ce qui avait déjà été vu par EBERSOLE *et al.*, 1974, *Arch. Biochem.*, *3*, 399) et le calcul amène :

$$\frac{V_o}{V_R} - 1 = \frac{I^{n'_i}}{K'_i} \quad \text{soit encore :} \quad \frac{V_o}{V_R} - 1 = \left(\frac{I}{I_{50}}\right)^{n'_i}$$

Lorsque $n_R = n_o$, mais dans le cas mixte (V/K), il vient (sauf erreur) :

$$\frac{V_o}{V_R} - 1 = \left(\frac{I}{I_{50}}\right)^{n_i} \frac{(K'_i + I^{n'_i})(K'_i - I_{50}^{n'_i})}{K'_i (K'_i + I_{50}^{n'_i})} + \frac{I^{n'_i}}{K'_i}$$

Or, si l'on admet la relation partielle de type V : $K'_i = I_{50}^{n'_i}$, l'équation précédente se résume de nouveau à :

.../...

$$\frac{V_o}{V_R} - 1 = \left(\frac{I}{I_{50}} \right)^{n'i}$$

Ce qui signifie que l'application de la forme logarithmique ne conduit pas seulement à la mesure de n_i, mais peut-être bien à celle de n'_i (et pas forcément d'un quelconque intermédiaire entre n_i et n'_i) dans le cas mixte ! C'est ce qui nous a incité à reconsidérer séparément les facteurs d'inhibition respectifs f_i (de type K) et f'_i (de type V) soit :

$$\frac{K_R}{K_o} - 1 = \frac{I^{n_i}}{K_i} \quad \text{ou} : \quad L_N \left(\frac{K_R}{K_o} - 1 \right) = n_i \, L_N \, I - L_N \, K_i$$

(fixation apparente de l'inhibiteur sur le même site que le substrat)

$$\frac{V_{M_o}}{V_{M_R}} - 1 = \frac{I^{n'i}}{K'_i} \quad \text{ou:} \quad L_N \left(\frac{V_{M_o}}{V_{M_R}} - 1 \right) = n'_i \, L_N \, (I) - L_N \, (K'_i)$$

(fixation de l'inhibiteur sur un site différent de celui du substrat)

Sous réserve des améliorations que doit apporter à la mesure des paramètres l'application des nouvelles formules de calcul, une première tentative effectuée au stade N_o a donné :

$n_i = 1{,}24$; $n'_i = 1{,}01$; $K_i = 910$ mM ; $K'_i = 575$ mM. ($n_i \simeq 1/n_o$!...)

Enfin, le cas où $n_o \neq n_R$, avec n_{50} correspondant à I_{50} a été abordé dans le cas le plus simple (type K) ; le calcul aboutit pour l'instant à la relation suivante :

$$\frac{V_o}{V_R} - 1 = \frac{\frac{I^{n_i}}{K_i} \cdot S^{(n_o - n_R)} + S^{(n_o - n_R)} - 1}{\frac{I_{50}^{n_i}}{K_i} \cdot S^{(n_o - n_{50})} + S^{(n_o - n_{50})} - 1}$$

Expérimentalement, dans un certain nombre de cas, le mécanisme est d'abord de type V prédominant puis tend vers le type K en fonction des concentrations croissantes de I.

Ce travail est donc encore loin de son terme, mais il permet déjà de comprendre l'origine de certains défauts de linéarité des courbes : $L_N \left(\frac{V_o}{V_R} - 1 \right) =$. $f\left[L_N \, (I^{n_i}) \right]$ et des anomalies rencontrées dans la détermination de n_i, comme vont le montrer les chapitres suivants.

b) Relations entre les coefficients de HILL initial (n_o) et résultant (n_R) en fonction de la concentration en Inhibiteur.

Jusqu'à présent, plusieurs hypothèses avaient été examinées empiriquement :

1er cas : $n_R = n_o - p.I^{n_i}$ avec $p = f(K_o, K_i)$

$L_N \, (n_o - n_R) = n_i \, L_N \, I + L_N \, p$

L'étude de 2 cas expérimentaux donne : $n_i = 0{,}53$ $p = 0{,}014$
$n_i = 0{,}40$ $p = 0{,}032$

soit $p \simeq \frac{K_o}{K_i}$ mais n_i non concordant avec les mesures précédentes.

2ème cas : $n_R = \frac{n_o + p.n_i \, I^{n_i}}{1 + p.I^{n_i}}$ avec $n_R \rightarrow n_i$ si $I \rightarrow \infty$

soit $L_N \, (n_o - n_R) = n_i \, L_N \, I + L_N \, p.(n_R - n_i)$
conduit au même résultat.

.../...

3ème cas : $\frac{1}{n_R} = \frac{1}{n_o} - b.I^{n_i}$ soit :

$L_N \left(\frac{1}{n_o} - \frac{1}{n_R} \right) = n_i . L_N\ I + L_N\ Q$: le calcul expérimental effectué dans 2 cas donne $n_i = 0,63$ $b = 0,014$

$n_i = 0,52$ $b = 0,022$

soit encore $b \simeq \frac{K_o}{K_i}$.

c) Relation entre constantes d'affinité initiale (K_o) et résultantes (K_R) et la concentration en Inhibiteur.

La relation $K_R = K_o \left(1 + \frac{I^{n_i}}{K_i} \right)$ reste, en principe, valable pour la phase de fixation de l'inhibiteur selon le type K, soit :

$$L_N\ (K_R - K_o) = n_i\ L_N\ I + L_N \left(\frac{K_o}{K_i} \right) .$$

Le calcul à partir des 2 séries expérimentales précédentes donne :

$n_i = 0,96$ $\frac{K_o}{K_i} = 0,024$ $\Longrightarrow$ $K_i = 125$

$n_i = 1,06$ $\frac{K_o}{K_i} = 0,007$ $\Longrightarrow$ $K_i = 328$.

Il subsiste donc une ambiguïté qui peut être attribuée à deux facteurs distincts :

- L'incertitude dans la détermination des paramètres n, K, V_M effectuée alors selon l'amélioration empirique (les calculs vont donc être révisés selon la méthode rigoureuse).
- L'absence jusqu'ici de schémas moléculaires expliquant les modifications du coefficient de HILL, ce qui introduit le chapitre suivant.

.../...

I-4. Théorie et Hypothèses sur le Mécanisme moléculaire de fonctionnement de l'α-glucosidase.

a) Bases théoriques

La théorie proposée ici a pour objet d'expliquer les variations du coefficient (n) de manière compatible avec les conceptions classiques du fonctionnement des enzymes.

La réaction globale se résume ainsi :

$n_S.S + n_E.E \rightleftharpoons$ (complexe) $\rightleftharpoons$ Produits + E

Le coefficient de HILL, quant à lui, traduit plutôt :

$n.S + E \rightleftharpoons$ (complexe) $\rightleftharpoons$ Produits + E

il apparaît donc comme une résultante (n_R) ramenant tout à 1 seule molécule E, ce qui revient à écrire :

$$\frac{n_S}{n_E} . S + 1.E \rightleftharpoons \text{(complexe)} \rightleftharpoons \text{Produits} + E$$

c'est-à-dire : $n_R = \dfrac{n_S}{n_E} = \dfrac{\text{nombre de sites occupés par le substrat}}{\text{nombre d'unités enzymatiques actives}}$

d'où les propositions suivantes.

1er Postulat

L'édifice enzymatique complet est composé de n_E sous-unités actives qui ne doivent pas être considérées comme 1 molécule d'enzyme (1E) mais comme un sous ensemble actif de n_E molécules associées en vue de réaliser une activité coopératrice (fig. 11-A) dont nous ne mesurons que le BILAN, illustré par l'équation de HILL !

2ème Postulat

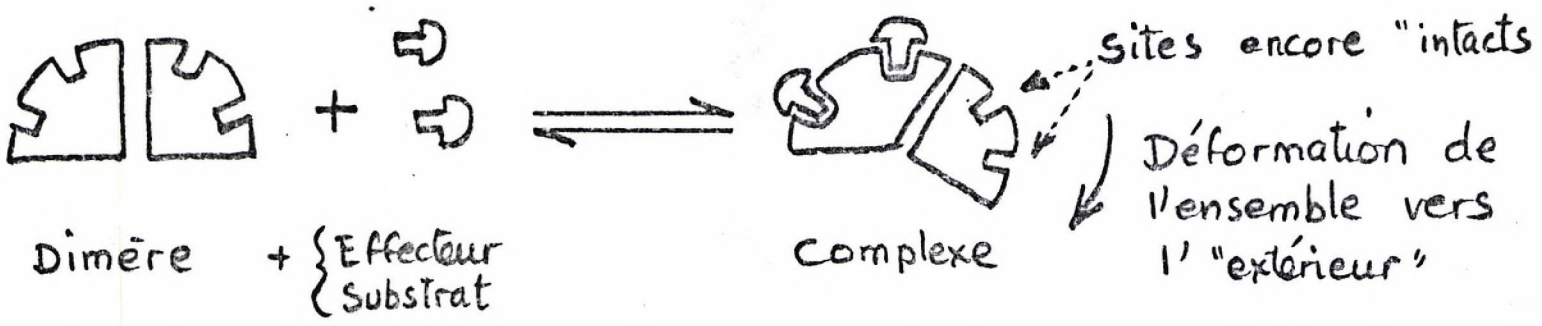
Chacun des n_E oligomères actifs possède au moins 2 sites (il peut être constitué de deux monomères accollés). Ces deux sites peuvent accepter chacun une molécule de substrat, et l'un des deux au moins une molécule d'effecteur (fig. 11-B).

3ème Postulat :

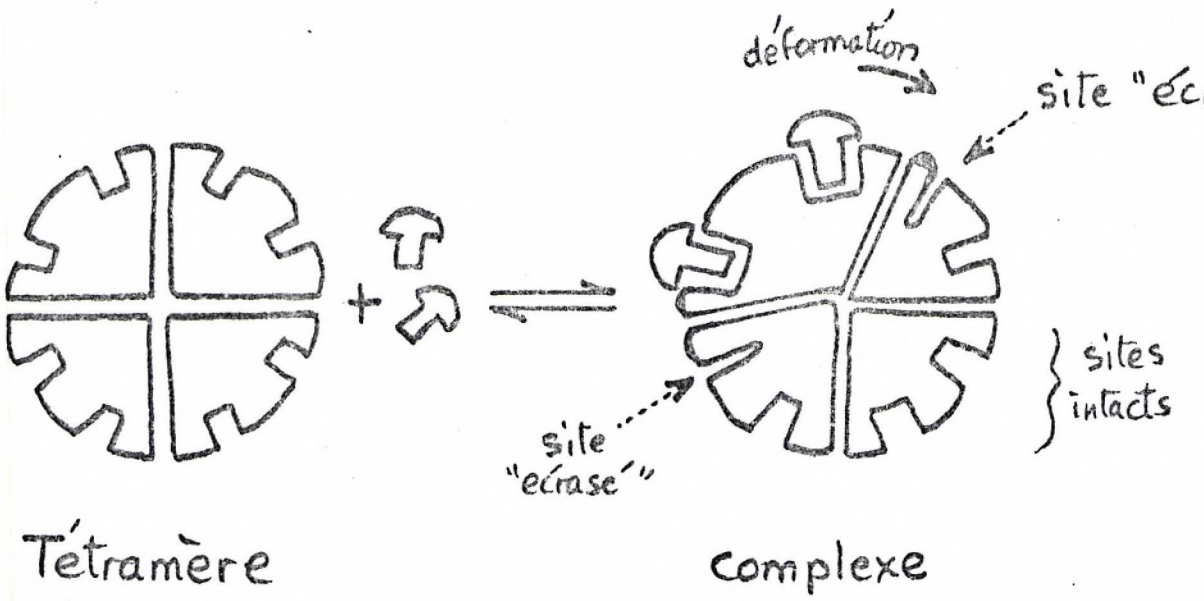
à partir d'un seuil de saturation, le nombre de sites occupés par S ou par I (ou les deux) peut conduire à une déformation de l'édifice et empêcher de nouvelles fixations.

Le schéma moléculaire peut supposer l'existence de 2 sites par oligomère actif : ces sites peuvent soit être identiques, soit tels que l'un au moins est interdit à l'inhibiteur (pour justifier le mécanisme mixte). Le cas le plus simple de deux sites identiques est illustré par la figure (11-A) et le cas mixte par la figure (11-B).

Il faut noter que l'effet d'exclusion de certains sites par encombrement dû aux sites voisins risque d'être plus élevé dans le cas d'un édifice complet que dans le cas d'un " polymère " partiel, comme illustré ci-dessous :



.../...



Exemple schématique de déformation par l'effecteur (ou substrat) avec exclusion de 2 sites sur 8 (cas exagéré pour la clarté de l'exposé)

Les variations du coefficient de HILL en fonction du taux d'exclusion peuvent être ainsi calculées aisément : pour un sous ensemble (m = 4) :

$$n_R = \frac{\text{nombre de sites " utiles "}}{\text{nombre d'oligomères actifs}} .$$

(pour 1 site exclu : $n_R = 1,75$ (pour 4 sites exclus : $n_R = 1,00$
(" 2 " " : $n_R = 1,5$ (" 5 " " : $n_R = 0,75$
(" 3 " " : $n_R = 1,25$ (" 6 " " : $n_R = 0,50$

Par extension, si l'édifice comporte 8 oligomères, les valeurs de n_R peuvent prendre toute la série des valeurs intermédiaires (soit par exemple : 0,625 ; 0,875 ; 1,125 ; 1,375 etc.).

On peut envisager également un nombre impair d'oligomères, mais la parité offre l'avantage d'être compatible à la fois avec les théories de la symétrie nécessaire aux transitions allostériques et celle de la coopérativité (négative) entre deux sous-ensembles complémentaires de structure identique (flip-flop).

Il n'est pas interdit de penser, toutefois, que certains variants génétiques (qualifiés parfois improprement d'isoenzymes) pourraient refléter simplement une modification du mode d'association des oligomères !

En ce qui concerne les mécanismes d'inhibition, plusieurs hypothèses sont envisageables, à travers 2 catégories principales d'éventualités :

. soit I et S peuvent se fixer indifféremment sur tous les sites.
. soit l'un des deux ligands est exclu de l'un des deux sites du monomère *m* actif.

Dans l'un comme dans l'autre des deux cas, lorsque l'édifice est complet (E = 4 m ou 8 m par exemple), les effets d'exclusion par encombrement stérique jouent pleinement. Ces effets peuvent être très différents selon la nature de S ou de I, d'où une large gamme possible des valeurs de n_o et de n_i, donc de n_R, qui devient alors :

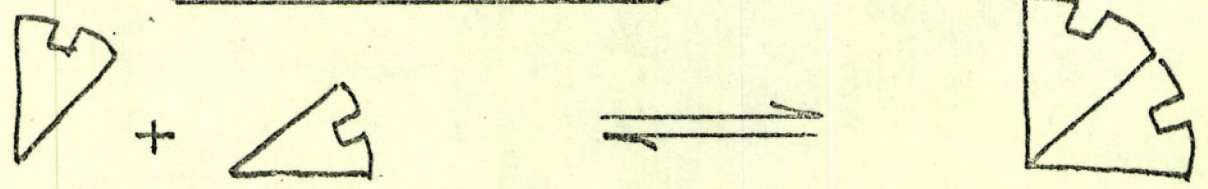
$$n_R = \frac{n_T - (n_i + n_{ex})}{n_E} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} n_T = \text{nombre total de sites ; } n_i = f(I) \\ n_{ex} = \text{sites condamnés par exclusions.} \end{cases}$$

A la limite, une structure telle que les sites récepteurs de S et de I soient totalement distincts peut encore conduire à une inhibition de type compétitif mixte, si l'exclusion stérique survenant dans les sites I étend ses effets aux sites S voisins : à partir d'un certain seuil, un site de I supplémentaire pourrait être occupé à condition d' " écraser " un site S encore inoccupé, ce qui revient au même qu'une occupation compétitive du site S.

Enfin, en supposant que dans le cas " Michaélien ", pour un ensemble (n = 8), l'exclusion du substrat par lui-même ne lui permette d'occuper que 8 sites ($n_o = 1$), il est permis de penser qu'un effecteur ayant pour action de " pincer " le site qu'il occuperait, permettrait d'annuler partiellement l'exclusion d'autres sites et d'augmenter ainsi la valeur de n (activation).

.../...

A. CAS SIMPLE



monomères (inactifs)

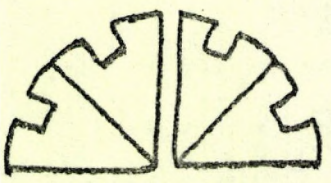
p.ex. P.M. = 50 000

oligomère actif = 1 molécule ($n_E = 1$) d'enzyme = E

P.M. = 100 000 - non coopératif

E + E

2 oligomères actifs



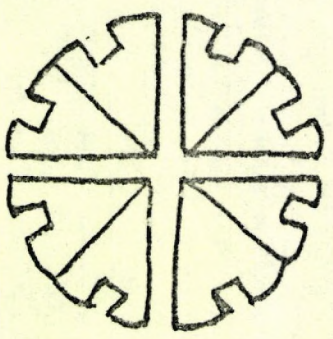
Sous-ensemble de P.M. = 200 000 (apparent)

Polymère partiel (2E) (ou $n_E = 2$)

coopérativité possible

2E + 2E

ou 4 x E

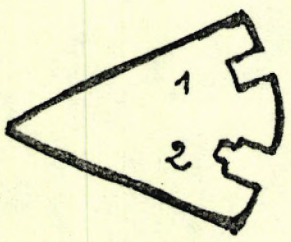


P.M. = 400 000 (pôds moléculaire du sous ensemble in toto)

Polymère complet (4E ou $n_E = 4$)

coopérativité et symétrie

B. CAS MIXTE



monomère

S ⇨ site 1 accessible au substrat seul

I ⇨ site 2 accessible au substrat et à l'inhibiteur

ligands

Dans ce cas, un sous ensemble actif $n_E = 8$ comporterait 16 sites possibles ($n_T = 16$)

Fig. 11 . Illustration simplifiée des hypothèses sur le fonctionnement des α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeille (les nombres de sites propres à chaque type d'effecteur ou au substrats sont étudiés expérimentalement)

.../...

En définitive, cette conception générale a pour mérite de simplifier les hypothèses et de concilier les diverses théories attachées aux variations de n. Elle assigne, en outre, une signification physiologique à l'équation de HILL !

b) La sanction de la vérification expérimentale.

Plusieurs arguments concourrent à étayer une telle sorte d'hypothèse :

. Chez l'Abeille, des formes moléculaires de P.M. voisins de 90 000 - 180 000 - 360 000 ont été décelées (BOUNIAS 1976, *Apidologie* 7, 263-275), les deux plus " lourdes " étant les plus communes, et celle de P.M. ≃ 360 000 paraît être la principale responsable de l'effet " type n " (BOUNIAS 1977, *C.R. Acad. Sc.*, 285, 1263-66).
En fait, à la fin du stade larvaire, toutes les formes intermédiaires (L5) comportant un noyau initial (P.M. ≃ 60 000) et de 1 à 7 oligomères de P.M. = 40 000 chacun, ont été décelées en faibles quantité.

. La gamme des valeurs du coefficient de HILL résultant (n_R) s'étend de 0,63 à 1,36 soit : de $\left(\frac{5}{8}\right)$ à $\left(\frac{11}{8}\right)$!

. Enfin, l'existence de deux constantes d'affinité (K_i, K'_i) et deux coefficients de fixation de l'inhibiteur (n_i, n'_i) trahissant deux modes d'action au moins pour le même inhibiteur, pourrait accréditer la théorie de l'exclusion selon le schéma proposé figure (11-B).

Il est important de souligner que des édifices enzymatiques actifs de tréhalase composés de 8 monomères ont été récemment caractérisés chez le rat (la dissociation en sous unités a été obtenue par l'action du " S.D.S. " habituellement employé pour ... affiner la précision des mesures de P.M. par électrophorèse en gel d'acrylamide !) (NAKANO *et al.* 1977, *J. Biochem.*, 81, 1041-1049). Il est, enfin, permis de se demander si le taux d'association des oligomères ne peut être lui-même assujetti à l'action de I, ou d'autres effecteurs sous contrôle physiologique (déterminismes génétiques compris).

Une hypothèse, même vérifiée, ne constitue jamais une fin en soi, mais un pas de plus vers d'autres concepts plus proches de la réalité. Dans le cas présent, il reste un très gros travail d'analyse cinétique comparée, en particulier sur les polymères qu'il conviendrait d'étudier individuellement à partir de préparations purifiées (si la conservation de leur activité le permet !)

Dans le cas, toujours possible, où deux oligomères actifs " travailleraient " chacun pour soi, et non plus dans le cadre d'un sous-ensemble coopératif, les paramètres mesurés expérimentalement proviennent de la superposition de deux cinétiques.

La collaboration avec Monsieur R. CALVET, professeur de Mathématiques va donc se poursuivre dans le but d'essayer de dégager les relations suivantes :

$V_{M_R} = f\ (V_{M1}$ et $V_{M2})$

$K_R = f\ (K_1$ et $K_2)$

$n_R = f\ (n_1$ et $n_2)$.

Ce thème converge également avec certains travaux de l'équipe du Professeur PACHECO (Biochimie LYON) avec lequel la concertation se poursuit.

.../...

Chap. II - ASPECTS HORMONAUX.

L'hypothèse d'une analogie avec le système hormonal du contrôle de la glycémie des vertébrés a été reprise de manière systématique, avec l'étude de l'injection intra-abdominale d'adrénaline, d'insuline et de glucagon, suivie de " prises de sang " et détermination de la glycémie à intervalles réguliers.

II-1. Matériel et Méthodes.

Les travaux ont été réalisés sur des abeilles naissantes, présumées les plus homogènes, et n'ayant encore jamais été en contact avec des aliments " extérieurs " Une abeille peut difficilement supporter plus d'une prise d'hémolymphe : pour chaque durée après injection, des lots de 4 à 5 abeilles ont reçu la même dose, administrée dans 0,5 µl d'eau distillée ou de KCl (5 mM). Des témoins ne reçoivent que le solvant, et la glycémie initiale des Abeilles du cadre est mesurée par sondages individuels tout le long des expériences.

L'hémolymphe prélevée est additionnée du même volume de mélange éthanol-pyridine (4-1) qui élimine la plupart des protéines et préserve la solubilité des glucides ; Des dépôts de 0,4 µl sont effectués sur plaques CCM. Après migrations, la révélation est effectuée par pulvérisation d'un réactif encore inédit donnant des tâches rouge-violet sur fond blanc. Les courbes d'étalonnage sont de la forme $\Sigma^{\infty} = p.C$ (Σ = surface des pics ; C = concentrations). Les coefficients d'étalonnage $^{\infty}$ sont déterminés par le calcul de régression de $L_N \Sigma$ sur L_N C puis la régression de Σ^{∞} sur C est établie et les valeurs inconnues déterminées par le report mathématique des inconnus sur la droite de régression, sans intervention manuelle graphique. Dans de nombreux cas, la précision du dosage atteint ± 1 %, parfois moins (± 0,2 %).

Résultats

.../...

II-2. Action de l'Adrénaline.

Les doses utilisées (Adrénaline Sigma E-4250) ont été les suivantes : 0,2 - 0,4 - 1 - 2 - 4 nanomoles par Abeille ($\overline{P} \simeq 110$ mg).

Le spectre d'absorption des solutions a été constamment suivi au cours des expériences, en raison d'une oxydation spontanée rapide de la molécule. Il a été nécessaire, en particulier, d'étudier comparativement les cinétiques d'oxydation et celles de mise en solution (fig. 12 et 13). Certaines expériences ont ainsi été réalisées à partir de solutions oxydées (au moins partiellement)*. Une bibliographie en cours sur ce sujet devrait permettre d'établir la nature chimique des solutions ainsi oxydées, grâce à l'étude de leur spectre. Il est important de noter, au passage, que dans les solutions les plus concentrées l'oxydation est la moins rapide, comme sous l'action d'une auto-protection telle qu'elle se rencontre chez l'acide ascorbique, par exemple (BOUNIAS 1978, *Ann. Zool.*, *10*, 289-302).

Sous réserve des modifications qu'apportera éventuellement cette étude de structure à l'interprétation finale des résultats, les premières séries de données numériques (8 à 12 mesures par dose) illustrées sur la figure (14) suggèrent, en résumé, les observations suivantes :

. L'Adrénaline est active sur la glycémie : les effets portent davantage sur le Glucose que sur le Tréhalose

. L'action sur la glucosémie atteint un maximum 30 mn après injection, sauf pour la dose la plus faible, dont l'effet est retardé à 2 H. L'amplitude de l'augmentation est maximale pour la dose 2 nmoles/Abeille, avec un rapport G/G_o atteignant 9,8. L'effet maximum est retardé à 2 H dans le cas de la dose la plus faible (0,2 nmole).

. L'action sur la Tréhalosémie se traduit par une faible augmentation au bout de 15 mn (significative dans le cas de la dose 2 nanomoles, seulement), suivie d'une chute au bout de 2 heures.

. Dans le cas des solutions oxydées, l'action est encore perceptible mais de manière atténuée (fig. 15). Tout se passe comme s'il se produisait une saturation des récepteurs annulant l'influence des concentrations au delà d'un seuil donné.

NB - Les données présentées résultent de calculs provisoires destinés à rendre compte le plus rapidement possible de l'ensemble des résultats. Les calculs définitifs, encore en cours, sont proches de leur aboutissement et conduiront aux publications.

* La confrontation avec les travaux de Mme le Professeur CHAIX (*Biochimica et Biophysica Acta*, *5* (1950) et *10* (1953) montre qu'il s'agit du stade o.quinone, avec une proportion d'Adrénochrome inférieure à 10 %.

.../...

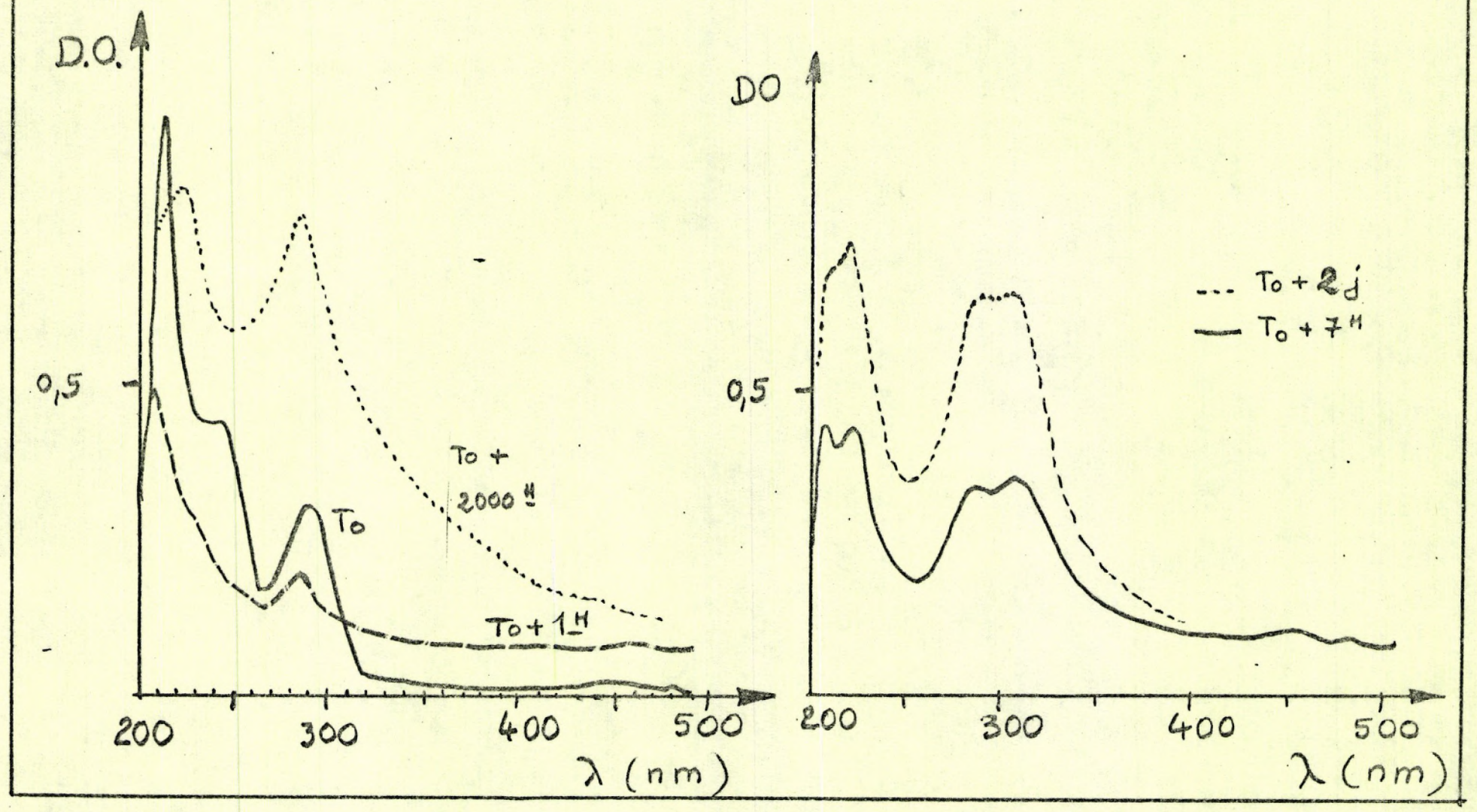
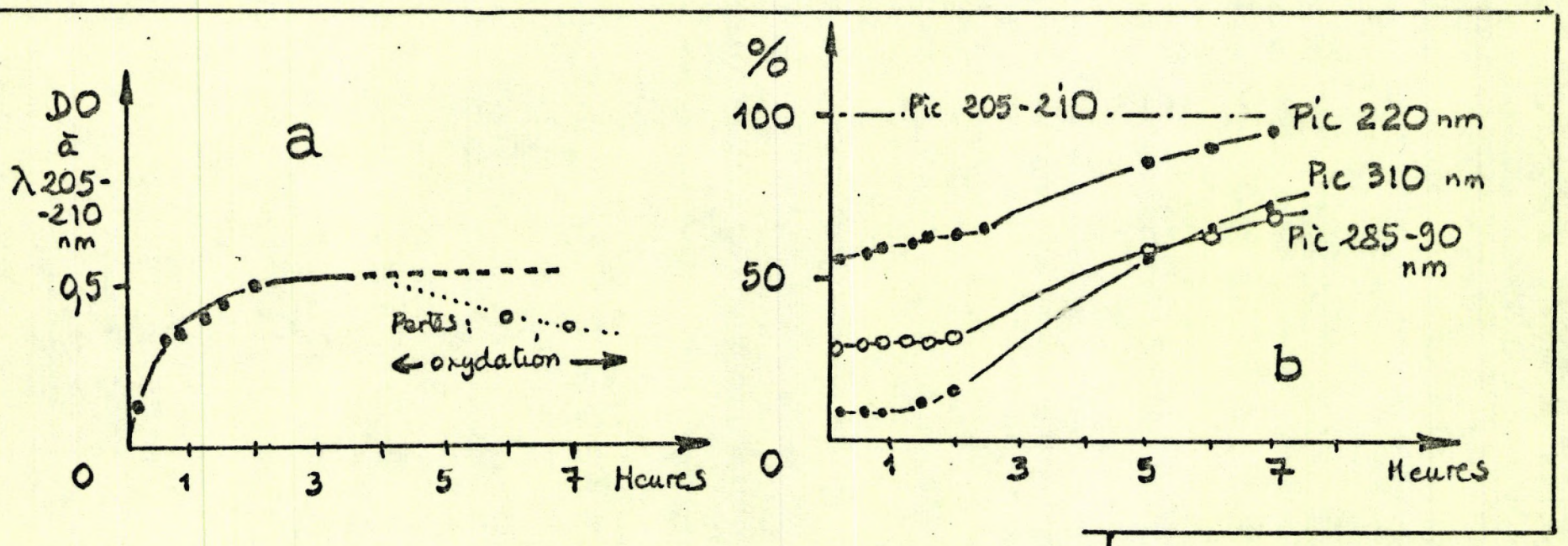


Fig. 12 : Evolution du Spectre de l'Adrénaline en fonction de son autoxydation (modification des pics en DO et λ)



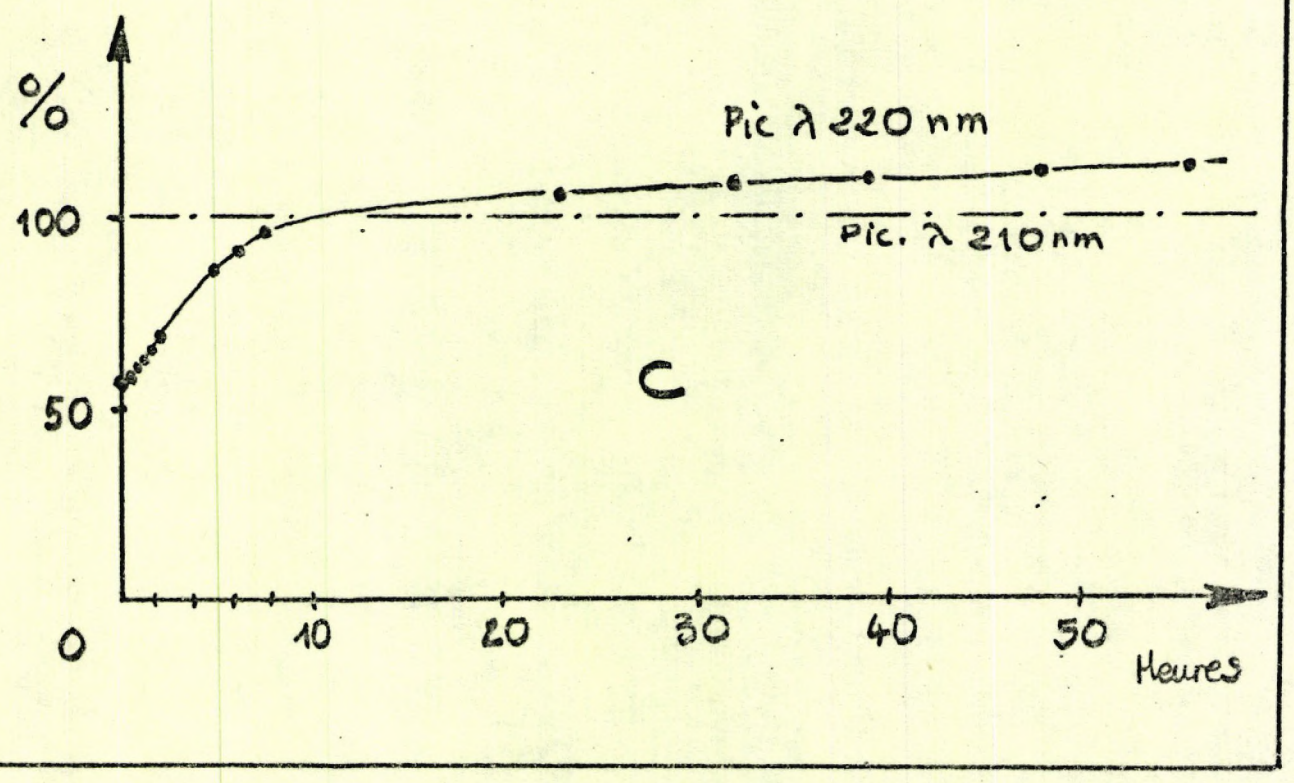


Fig. 13 :

a. mise en solution ...

b. oxydation à court terme ...

c. oxydation à long terme ...

... de l'Adrénaline (in vitro)

.../...

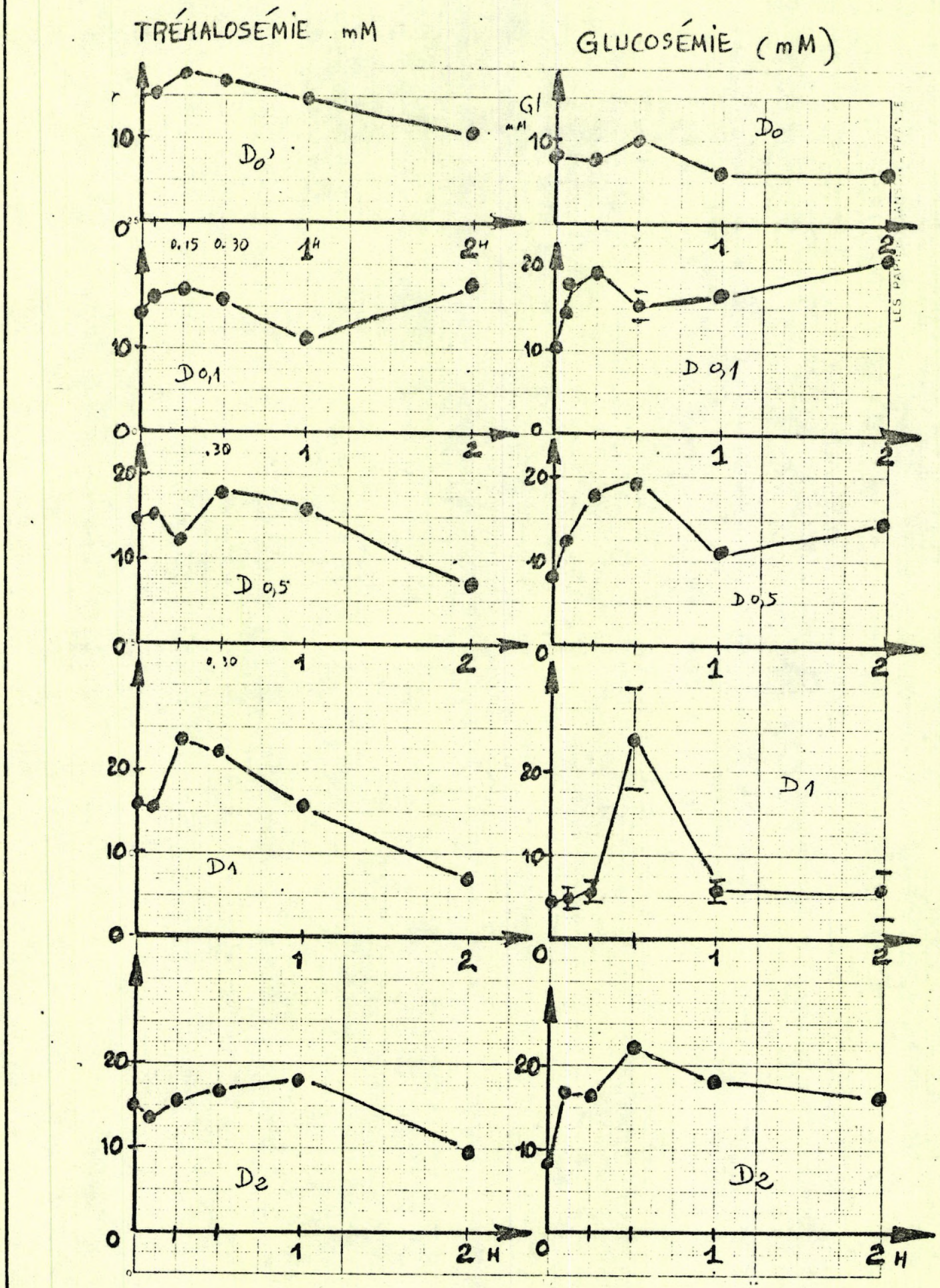


Fig. 14 . Action de l'injection d'Adrénaline (forme non oxydée) sur la glycémie de l'Abeille .

.../...

II-3. Action de l'Insuline.

L'insuline extraite du pancréas de Boeuf (Sigma I-5500) a été injectée aux Abeilles à raison de 4 doses différentes :
10 - 50 - 100 - 500 nanogrammes par Abeille (soit environ 1 mg par Kg pour la dose 100). La glycémie a été suivie pendant 3 heures après injections, à partir de lots de 4 à 5 Abeilles pour chaque temps (soit 35 Abeilles pour une cinétique).

Les premiers résultats, illustrés par la figure (16) permettent d'apporter les conclusions suivantes :

. L'Insuline est active sur la glycémie : Glucose et Tréhalose répondent de manière comparable.

. L'hypoglycémie est perceptible au delà d'une heure et atteint son maximum d'effet généralement 2 H après injection, sauf pour la dose la plus forte. L'amplitude de la variation G/G_o atteint des valeurs de l'ordre de 1/7.

. L'effet est mieux marqué pour la dose la plus faible. La dose la plus forte entraîne des réactions de sens contraire avec tendance à un rétablissement temporaire au bout de 2 H, suivie d'une rechute.

Il convient d'oberver que de récents essais d'injection d'Insuline à des Invertébrés Gastéropodes ont conduit les auteurs à envisager l'existence d'un analogue de l'Insuline dont la sécrétion pourrait provenir de cellules intestinales constituant les homologues des cellules pancréatiques (RAJAN *et al.*, 1977, *Current Science*, 47, 248-249).

.../...

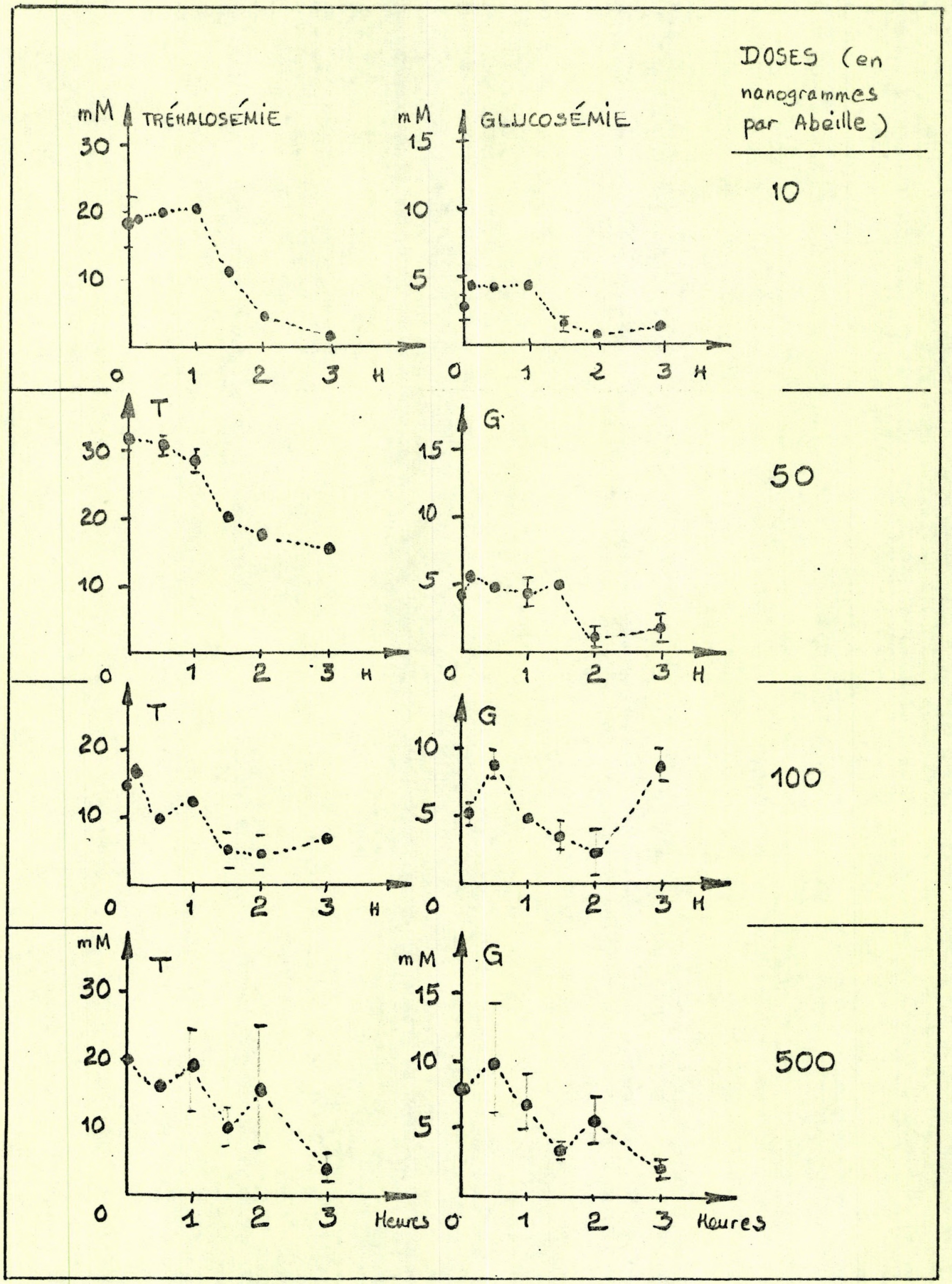


Figure 16. Action de l'Injection d'Insuline sur la glycémie de l'Abeille

.../...

II-4. Action du Glucagon

Les injections de glucagon extrait de pancréas de Boeuf et de Porc (Sigma G 4250) ont été effectuées simultanément à celles d'Insuline, car la nécessité d'opérer un des échantillons différents, à des intervalles de temps parfois assez longs (semaines, mois) d'une dose à l'autre, assujettit les réponses obtenues à la variabilité des individus de chaque cadre de couvain utilisé (et ceci, bien que tous les essais soient réalisés à partir de la même colonie). Les mêmes doses ont été appliquées.

Les premiers résultats obtenus (5 à 10 mesures par point), illustrés par la figure (16), suggèrent d'ores et déjà les conclusions suivantes :

. Le Glucagon est actif chez l'Abeille en tant qu'hyper-glycémiant

. La glucosémie augmente et passe par un maximum 1 H 30 après injection, sauf dans le cas de la dose la plus élevée : 1 H après injection.
L'hyper-glucosémie est suivie d'un rétablissement 2 à 3 H après injection.

. La réponse de la tréhalosémie est différente, avec tendance à atteindre l'augmentation maximale de manière plus rapide en fonction des doses croissantes, sauf pour la dose la plus élevée (500 ng) qui se traduit par deux " poussées " 1 H et 2 H après injection. Les maxima sont toujours suivis de chutes vers un niveau inférieur à la normale.

Contrôle spectrophotométrique des solutions.

Le Glucagon et l'Insuline présentent des maxima d'absorption respectifs, en lumière U.V., à 278 et 280 nm avec des coefficients d'extinction $E^{1\%}_{1cm}$ de 23,8 et 10,00 unités.

Les solutions diluées à 20 mg/l à partir des solutions-mères ont été examinées au spectrophotomètre 24H après les dernières injections (La dilution et la conservation à l'état dilué sont deux des plus importants facteurs d'incertitude).

Les mesures ont permis d'assigner aux solutions utilisées les titres résiduels suivants : Glucagon : 17,2 mg/l (-14 %)
Insuline : 19,6 mg/l (-2 %).

.../...

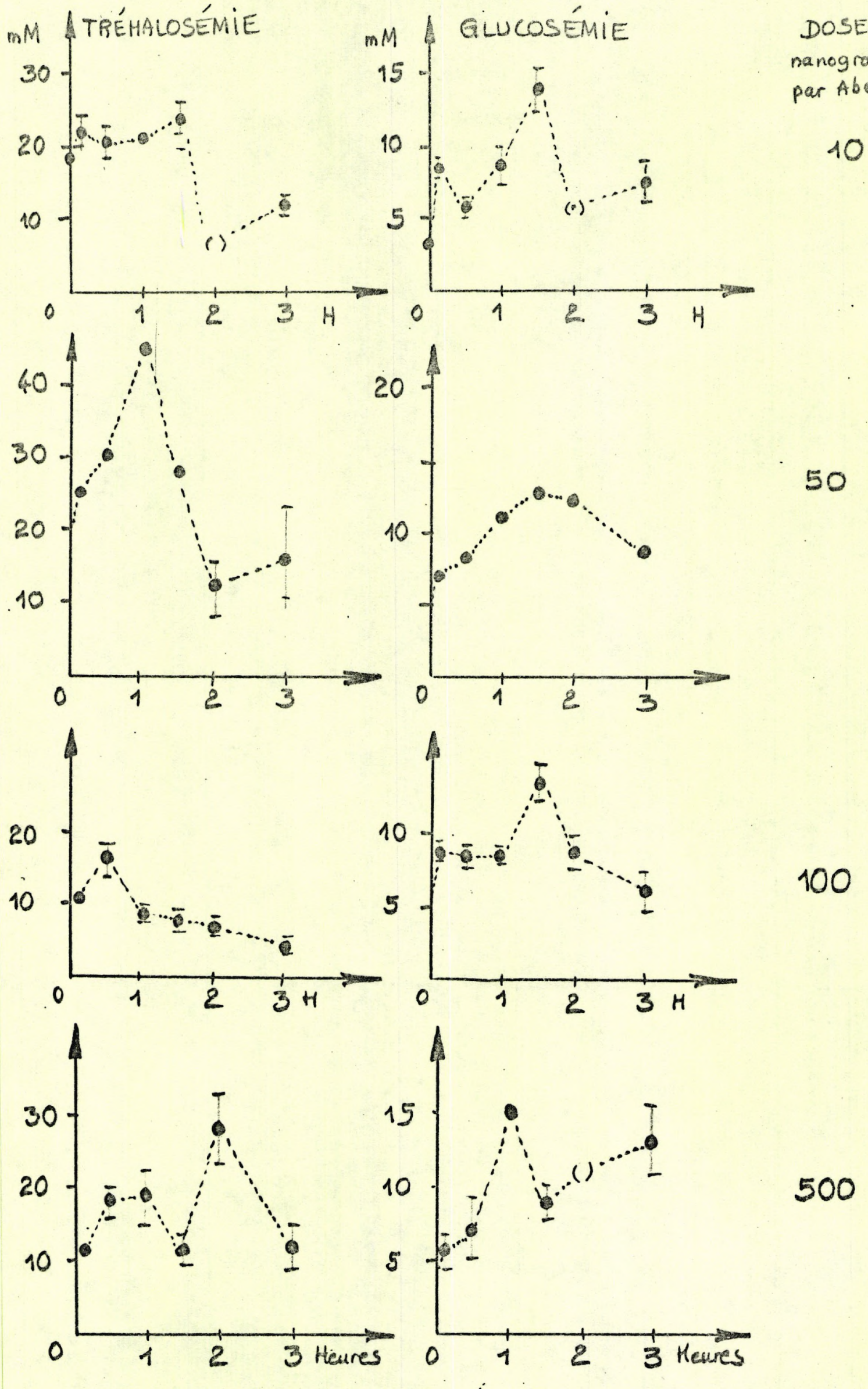


Fig. 16. Action de l'injection de Glucagon sur la Glycémie de l'Abeille

.../...

II-5. Discussion.

L'ensemble de ces résultats montre que les récepteurs de l'Abeille sont sensibles à l'action des hormones provenant de vertébrés, que les réponses de la glycémie sont de même sens, et les temps de réactions assez comparables.

Cela ne signifie pas pour autant que ces hormones sont celles de l'Insecte, mais qu'il existe au moins une analogie structurale suffisante pour leur conférer une activité importante (Cf. Chap. " Projets "). Il apparaît, en outre, que l'injection de ces hormones doit provoquer en retour une sécrétion d'effecteurs endogènes qui entraînent, dans de nombreux cas, une réponse ultérieure en sens opposé.

L'existence chez l'Insecte de substances voisines de l'Insuline et du Glucagon est accréditée par la récente découverte d'un analogue radio immunologique de d'Insuline chez un Lépidoptère (*Manduca sexta*) et dans la gelée royale de l'Abeille (KRAMER *et al.* 1977, *J. Insect Physiol., 23*, 293-295), et d'un analogue radio immunologique du glucagon chez le même *Manduca sexta* (TAGER *et al.* 1975, *Nature, 254*, 707-708 ; 1976, *Biochem. J., 156*, 515-520).

De son côté, la synthèse d'Adrénaline proprement dite paraîtrait d'autant plus crédible qu'il a été trouvé de la noradrénaline dans la cire des rayons d'Abeilles (BOURDON *et al.*, 1977, *Arch. Int. Physiol. Bioch., 85*, 945-947), dans le miel (LECOMTE *et al.*, 1976, *Arch. Int. Physiol. Bioch., 84*, 877-878) dans le venin d'Abeilles:115 ng par ampoule (OWEN 1971, *Experientia, 27*, 544-45) et enfin, dans l'enveloppe du nid de la Guêpe commune (BOURDON *et al.*, 1975, *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège, 5-6*, 474-476). Par ailleurs, sachant que l'adrénaline et la nor-adrénaline sont capables d'accélérer le rythme cardiaque de la Blatte (MILLER *et al.*, 1968, *J. Insect Physiol., 14*, 383-394), l'hypothèse d'une analogie assez complète entre le système adrénergique des vertébrés et celui des Insectes paraît d'autant plus plausible.
Enfin, au moment même où ces lignes viennent d'être écrites, un tiré à part vient confirmer chez l'Insecte l'action de la nor-adrénaline (et également celle des acide aspartique et γ amino butyrique) sur l'AMP cyclique, dont la libération chez les vertébrés s'effectue sous l'action de l'adrénaline ou du glucagon.
(TAYLOR 1978, *Diss. Abst. Int., b, 10*, 4673-4674).

Il convient de rappeler inversement, que dès 1956 une substance soluble dans l'acétone, extraite de la gelée royale d'Abeille, montrait des propriétés fortement hyper-glycémiantes chez le rat (CHAUVIN 1956, *C.R. Acad. Sc., 243*, 1920-1921) ; mais la mise en évidence, peu après, d'un facteur hyper-glycémiant dans le pollen, laissait planer le doute quant à l'origine de la substance, quoique dans ce dernier cas il paraîsse s'agir d'un peptide (CHAUVIN 1957, *C.R. Acad. Sc., 244*, 120-123).

.../...

Chap. III - APPLICATIONS AGRONOMIQUES.

III-1. Glycémie et Productivité.

L'Hypothèse initiale d'une corrélation exploitable entre les capacités biochimiques énergétiques et les aspects d'intérêt agronomique de la biologie des Insectes pouvait trouver un premier débouché au niveau de la productivité en miel des colonies d'Abeilles. En effet, de deux colonies placées dans les mêmes conditions de travail, celle dont les individus seront capables d'aller butiner le plus loin, de transporter davantage, de sortir malgré le climat défavorable, aura de fortes chances d'être la plus productive (ce n'est pas le seul, mais un des aspects déterminants du problème).

Mais cette question n'aurait même pas mérité d'être abordée, si comme on le supposait depuis longtemps (BEUTLER 1947, *Z. Verg. Physiol.*, *24*, 71-115) (d'après LENSKY, in : Traité de Biologie de l'Abeille, vol.1, p.481) la glycémie de l'Abeille n'était pas régulée mais soumise à des fluctuations aléatoires.

Or, des arguments concrets sont maintenant venus étayer l'hypothèse de l'existence d'un ensemble de voies enzymatiques et hormonales de régulation.

La glycémie elle-même pouvait donc constituer dès cet instant un critère possible d'appréciation de l'énergie disponible (capacité du " réservoir de combustible ") de même que la réponse aux épreuves à l'hyper ou à l'hypo-glycémie provoquées (débit des " injecteurs " de carburant).

La mise en place d'un rûcher destiné à cette étude, envisagée dès 1975, passait au stade de la réalité en 1977, et 10 ruches de chacune des 3 races : mellifica, ligustica, caucasica, et de leurs hybrides triples (LxC)xM étaient placées dans les mêmes conditions de travail.

La densité des expérimentations sur l'action des hormones n'a pas permis, cette année, d'analyser la glycémie au niveau du couvain, mais seulement en fin de saison, chez les butineuses pré-hivernantes. Sous réserve des vérifications concernant d'éventuels changements de reines ou croisements accidentels, une première série d'analyses a permis d'établir entre la productivité et la glycémie les relations suivantes illustrées par la figure (17) :

Souches :	Rendement (R)			Tréhalosémie (T)			Glucosémie (G)			Fructosémie (F)		
	$\bar{x}$	Kg(N)	σ_x	$\bar{x}$	mM(N)	σ	$\bar{x}$	(N)	σ	$\bar{x}$	(N)	σ
Ligustica	9,05	(9)	6,7	31,7	(34)	17,4	18,9	(29)	5,9	5,97	(29)	7,8
Mellifica	18,3	(10)	3,35	42,38	(27)	15,6	27,1	(28)	10,9	10,8	(29)	10,9
Caucasica	29,1	(8)	6,68	54,05	(24)	11,7	31,8	(24)	22,4	26,24	(24)	25,0
(LxC)xM	43,2	(12)	8,82	59,86	(26)	22,56	61,4	(27)	44,4	47,2	(27)	45,1
(LxC) en ruchettes	——			25,09	(12)	11,45	23,1	(12)	11,6	9,62	(12)	6,54

.../...

Corrélation à partir des moyennes (et régression indicative : y = a + bx)

T/R : ρ = 0,976 b = 0,839 a = 26,18

G/R : ρ = 0,952 b = 1,21 a = 4,79

F/R : ρ = 0,994 b = 1,32 a = -10,8

L'étude particulière à partir des données individuelles et à l'intérieur de chaque race est en cours : la variabilité de la fructosémie et celle de la glucosémie pourraient être dues soit à une hétérogénéité de population avec subdivision à parts égales en souches à forte et faible fructosémie, soit à un dimorphisme physiologique correspondant à la disparité déjà observée entre butineuses et hivernantes vraies (*Comp. Biochem.*, 1978, *61*, 13-18).

Cependant, la glycémie et tout particulièrement la Fructosémie apparaît comme un indice sérieux de la productivité des colonies. Un procédé très simple et peu coûteux est en voie de mise au point : sa diffusion permettrait aux apiculteurs d'éprouver eux-mêmes les capacités glycémiques de leur cheptel et par conséquent leur potentiel de production, ce dont il n'existe actuellement aucun équivalent au monde !

La fiabilité de la réponse à cette épreuve pourrait d'ailleurs constituer en elle-même un premier objectif de pré-sélection destiné à accroître l'efficacité de la sélection suivante basée sur la productivité.

.../...

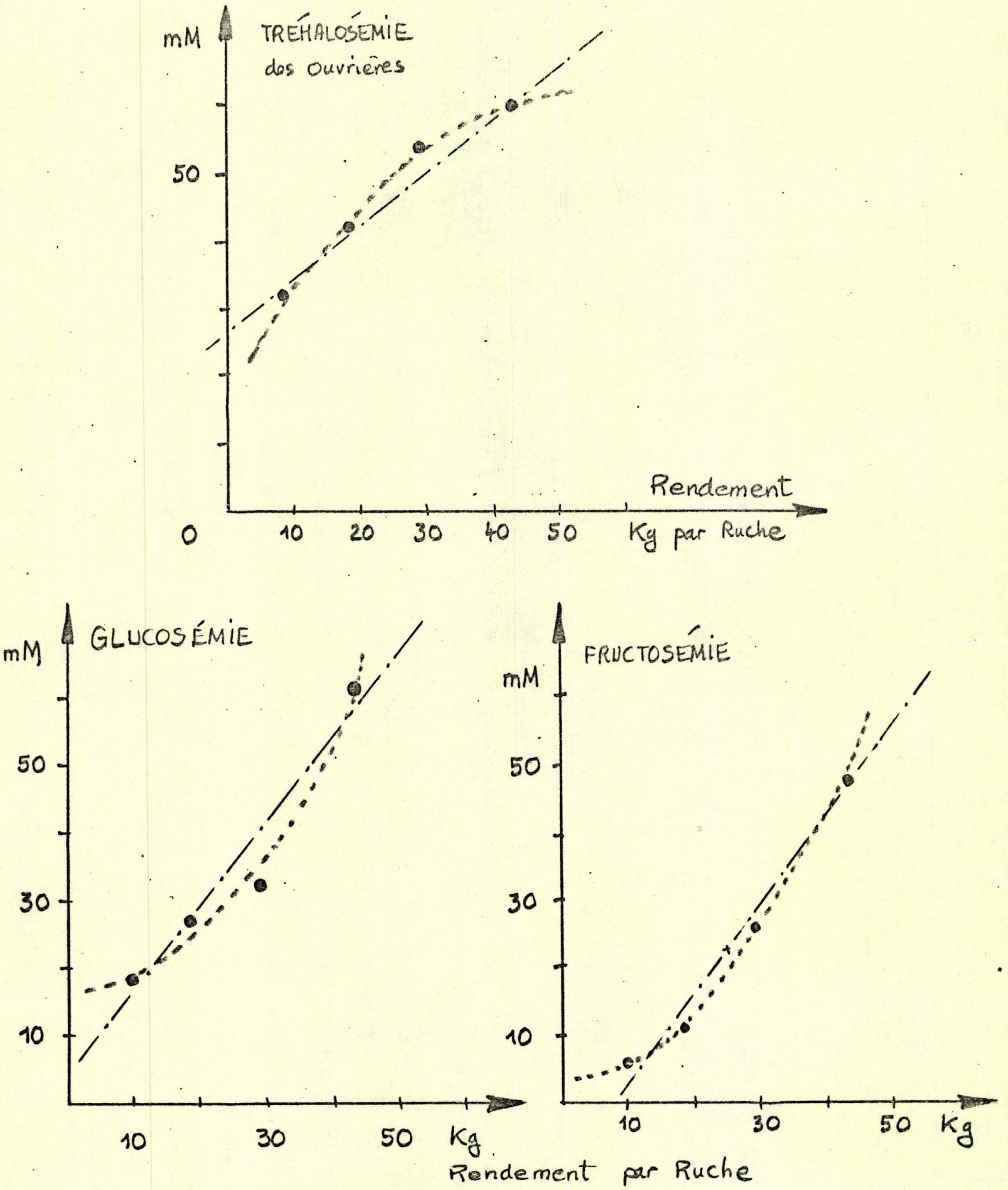


Fig. 17. Corrélations entre la productivité (Rendement en miel) et la glycémie des Abeilles ouvrières.

—.—.— Droites de régression

..... forme suggérée par la disposition des points.

.../...

III-2. Phosphatases et Productivité.

Une première étude cinétique détaillée des phosphatases alcalines de l'intestin des 3 mêmes races d'Abeilles a été effectuée aux stades " naissantes " et " butineuses ", mais sur une seule colonie de chaque race pour l'instant. La vitesse maximale paraît être ici en corrélation négative avec le rendement, mais il convient d'attendre les résultats d'une étude plus complète avant d'avancer des conclusions.

Cet aspect du problème est cependant complémentaire du précédent, ce qui nous amène au chapitre suivant, consacré à un essai de synthèse.

.../...

Chap. IV - DISCUSSION GENERALE.

La voie de la glycolyse, centre de la production d'ATP, passe par la formation de fructose-6-P et fructose 1-6 di P. L'importance métabolique de ce dernier ressort d'autant plus que l'étape suivante du catabolisme constitue une plaque tournante vers la formation du phospho-glycérol et des glycérides d'une part, ou vers l'acide pyruvique et l'acétyl-CoA d'autre part, c'est-à-dire une 2e charnière entre la suite de la glycolyse (cycle de Krebs) et la synthèse d'acides gras ! (fig. 18)

Qu'y aurait-il donc d'étonnant, lorsqu'on se remémore ce schéma, à trouver le fructose à la clé d'un problème énergétique, et encore les phosphatases dont l'activité peut être déterminante à ce niveau !

D'autre part, les inter-relations — voire la compétition — entre glucides et lipides, comme sources d'énergie, passent par les mêmes noeuds métaboliques et doivent être assujetties à des mécanismes de régulation enzymatiques et hormonaux. S'il est vrai, sur ce point, que les hormones peptidiques endogènes de l'Insecte, actives sur la glycémie et sur la lipémie, sont respectivement de structure différente (HOLWERDA *et al.*, 1977, *Insect Biochem.*, *7*, 151-157), il ne faut pas oublier, cependant, que la seule tentative, à notre connaissance, d'administration d'hormones de vertébrés à des extraits *in vitro* de corps adipeux d'Insectes, a fait apparaître respectivement une inhibition de la sécrétion de triglycérides et acides gras par l'Insuline et une stimulation de la sécrétion d'acides gras par l'Adrénaline (BHAKTHAN & GILBERT, 1968, *Gen. Comp. Endocrinol.*, *11*, 186-197).

Il faut donc s'attendre à une action à double effet des hormones (effets glucidiques et lipidiques) et c'est au niveau du mécanisme d'inflexion préférentielle vers les voies spécifiquement glucidiques ou lipidiques observées selon les espèces, qu'il conviendra de rechercher la clé du débouché agronomique des recherches en cours (lutte " métabolique ", par exemple, par création d'antagonismes entre caractères biochimiques et éthologiques).

Rappelons enfin le schéma du circuit des lipides en tant que " combustibles " pour l'énergie du vol, tel qu'il a été proposé chez les orthoptères (BEENAKKERS *et al.* 1968, *J. Insect Physiol.*, *14*, 481-494) et symétriquement, celui de l'utilisation des lipides (fig. 19).

Il apparaît maintenant avec plus de netteté comment devront s'orienter les recherches à moyen et long terme : déterminer des facteurs d'Equilibre du contrôle hormonal de la biogénèse des glucides et des lipides et inter-action entre les hormones et les systèmes enzymatiques-charnières (lipases et osidases , phosphorylases + phosphatases).

.../...

Il reste un certain nombre d'expériences à réaliser dès que possible chez l'Abeille pour parachever les travaux en cours, avant de transposer les recherches chez les Noctuidés; la transition devrait commencer à s'opérer dès le 2e semestre 1979.

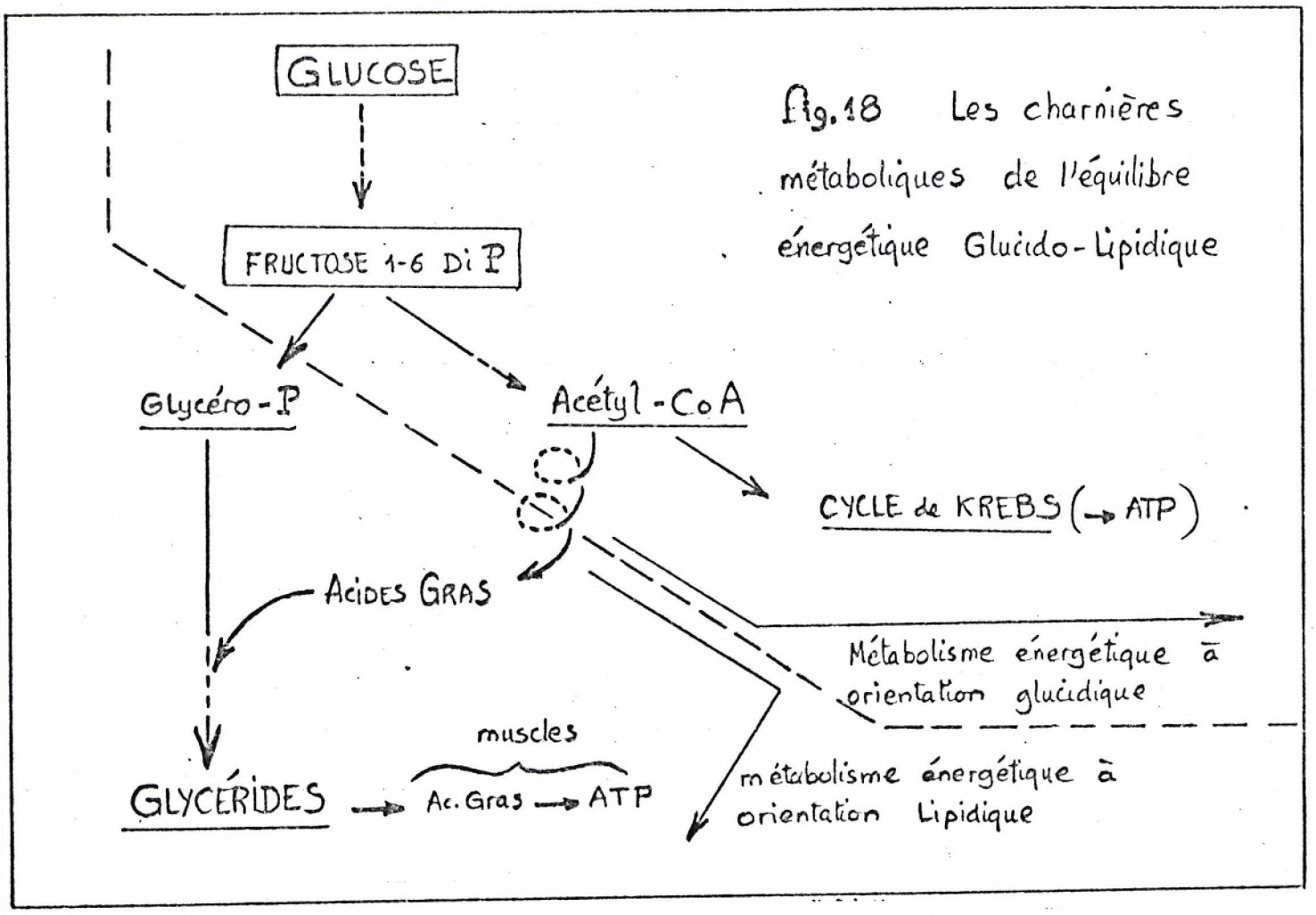


Fig.18 Les charnières métaboliques de l'équilibre énergétique Glucido-Lipidique

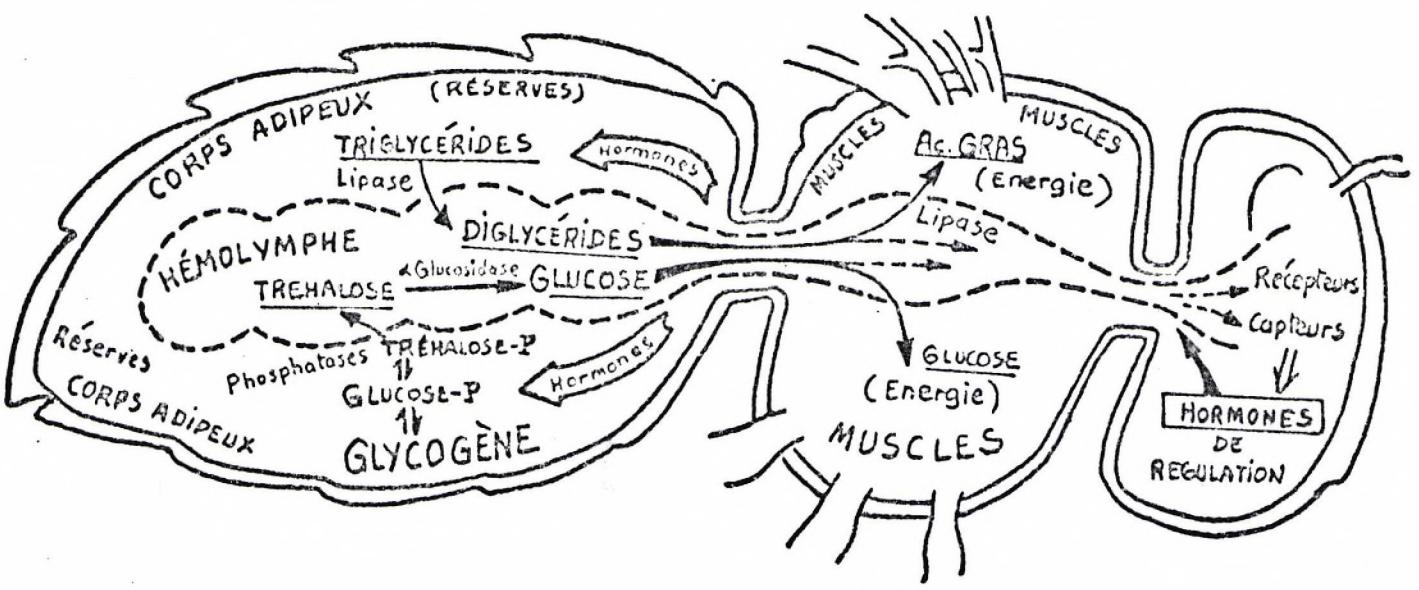


Fig. 19. Les voies d'utilisation des réserves énergétiques glucidiques et Lipidiques chez l'Insecte.

.../...

Troisième Partie

Projets expérimentaux et Bibliographie

I - PROJETS.

Les projets suivants sont classés selon leur délai souhaitable de mise en oeuvre.

A- A court terme (1 an à 2 ans maximum)

1°- Etude théorique des équations résultant de la somme de deux cinétiques de paramètres distincts (cas de deux oligomères actifs coexistants mais non coopérants).

2°- Comparaison des cinétiques de Phosphatases alcalines intestinales des 3 races et de leurs hybrides, en relation avec le rendement.

3°- Vérification de la nature de l'induction d'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe par le substrat naturel.

4°- Suite de l'étude comparée de la glycémie de 3 races et leurs hybrides, en relation avec le rendement (stades naissantes et butineuses) et comparaison de l'équilibre glucose-fructose dans les miels en fonction de celui mesuré dans l'hémolymphe des Abeilles.

5°- Comparaison du mode d'action des Hormones sur les 3 races (épreuves par injections intra thoraciques — étude détaillée sur Mellifica).

6°- Comparaison des propriétés cinétiques des α-glucosidases chez 3 races et hybrides (en relation avec le rendement).

7°- Structure oligomérique de l'α-glucosidase de l'hémolymphe d'Abeilles.

8°- Etude de la Nature des hormones endogènes de l'Abeille : recherche des homologues de l'Adrénaline, de l'Insuline, du Glucagon. Biosynthèse des adrénergiques.

9°- Etude préliminaire des classes de lipides chez quelques Noctuidés (à l'occasion de la mise au point finale des techniques de CCM).

B- A moyen terme (2 à 5 ans)

1- Comparaison de la lipémie et de la glycémie chez les Noctuidés en fonction de leurs caractères : { sédentaires / migrateurs } { sans diapause / avec diapause : { avant / pendant / après. }

.../...

2- Inter-relations Glucido-lipidiques :

1ère phase (enzymatique)

- Etude cinétique { des α-glucosidases / d'une lipase (choisie d'après § 1) } de l'hémolymphe
  et recherche des facteurs naturels de régulation dans l'hémolymphe.

2ème phase : hormonale

- Etude des hyper et hypo-glycémies provoquées :

  a) par les hormones — incidences sur l'activité enzymatique.
  b) par l'injection de glucides (et autres facteurs) — incidences sur l'activité des hormones.

C- A long terme (plus de 5 ans).

- Essai de maîtrise des facteurs déterminant l'équilibre du métabolisme énergétique glucido-lipidique et ses intéractions cérébrales ou neuro hormonales.
- Visée à terme : orientation vers une meilleure compréhension du phénomène (vie → mort). Premières approches par l'étude cinétique des mécanismes biochimiques accompagnant la Transition.

.../...

II - BIBLIOGRAPHIE DU LABORATOIRE.

A- TITRES PARUS :

BOUNIAS, M., 1978. Intra glycemic relations occurring during the development of Honeybees workers (*Apis mellifica, mellifica L.*). *Comp. Biochem. Physiol., 61 A*, 13-18.

BOUNIAS, M., 1978. Paramètres cinétiques d'oxydation de l'acide ascorbique par l'eau oxygénée *in vitro*. Application à la préparation de l'acide déhydro-ascorbique pour l'étude de la nutrition artificielle de Lépidoptères phytophages. *Ann. Zool. Ecol. Anim. 10*, 289-302.

BOUNIAS, M., 1979. Variations in the HILL parameters of haemolymph α-glucosidase kinetics as compared by a new algebraic method at three nymphal stages of workerbees (*Apis mellifica, mellifica L.*). *Comp. Biochem.*, Réf. 314 B (mis sous presse le 13/12/78).

BOUNIAS, M. & CALVET, R., 1979. Détermination des propriétés cinétiques d'une phosphatase alcaline de l'intestin d'Abeilles au moyen d'une nouvelle méthode algébrique rigoureuse. *C.R. Séances Sté de Biologie* (mis sous presse le 22/12/78).

B- PUBLICATIONS EN COURS DE REDACTION :

Liste page suivante.

.../...

PUBLICATIONS EN PREPARATION

Données expérimentales entièrement acquises fin 1978.

Pour 1979

1- Comm. : Action Adrénaline (*C.R. Acad. Sc.*).

2- Comm. : Action Insuline et Glucagon (*C.R. Acad. Sc.*).

3- Publication : Mode d'action détaillé (doses etc.) Adrénaline, Insuline, Glucagon (*B.B.A. ou Experientia*).

4- Publ. : Paramètres d'activité α-glucosidase / Glucose, Glycémie (*Comp. Biochem.*).

5- Publ. : ASC/DHASC : Glycémie / Aminoacidémie carpocapse (*Ann. Zool.*).

6- Publ. : Protéines intestinales comparées / 3 races Abeille.

7- Publ. : Phosphatases alk. Intestinales comparées / 3 races Abeille.

8- Publ. : Glycémie comparée : 3 races + Hybrides Abeille (*Comp. Biochem.*).

9- Comm. : Corrélation Glycémie / Productivité.

10- Comm. : Modèle moléculaire α-glucosidase / Paramètres d'inhibition mixte de type " n ".

11- Comm. : Zymogrammes comparés : divers organes / 3 races Abeille.

12- Publ. : La CCM des Amino-acides de l'hémolymphe d'Insectes (*Analusis : II*).

13- Ouvrage : La Biochimie et l'Abeille.

Pour 1980 (Matière rassemblée)

14- Monographie : La **nano** C.C.M. (Glucides - Lipides - Am. Ac. - Pigments - Ac. Org. - Vitamines - Hormones ...).

15- Mise au point bibliographique : Régulation du métabolisme glucidique des Insectes.

16- Mise au point bibliographique : Développements récents de la Cinétique enzymatique.

.../...

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - BILANS.

Le laboratoire de Biochimie s'est vu attribuer, finalement, son identité budgétaire en 1978 (code 21-291), et les facilités inhérentes à la disposition d'un budget établi (même faible) se sont traduites par une accélération du rythme d'expérimentation.

Le Bilan d'utilisation des crédits de fonctionnement et d'équipement est indiqué ci-dessous.

A- EQUIPEMENT (695-22).

Attribution : 37 000 F

Achats :	1	Balance mécanique au 10^{-2} mg Portée 160 g. Réf. 2474	)	
	2	Balance électronique au $10^{-1}/10^{-2}$ g Portée 1600 g. Réf. 3716	)	19 918, 11 F
	3	Calculatrice programmable (sur cartes magnétiques).		2 346, 12 F
	4	Appareil de Nettoyage à Ultra-sons.		3 786, 72 F
*	5	pH mètre + Agitateur magnétique.		5 415, 48 F
*	6	Ensemble Réfrigérateur + Congélateur à 2 groupes.		3 440, 00 F
	7	Compresseur de laboratoire.		2 056, 00 F
		Total :		36 936, 43 F

(*) Les postes 5 et 6 ont été avancés d'1 an en raison de la défection des anciens appareils, survenue plus tôt que prévu. Il s'agit en fait d'une simple permutation avec les postes équivalents attribués en 1979.

B- FONCTIONNEMENT.

Le tableau ci-dessous résume l'état des dépenses pour chacune des catégories prises en compte au laboratoire (attribution : 16 000 F).

Compte	Subdiv.	Identification	Engagements	Dépenses	Bilan
634-1	A	Matériel de Labo.	9 000	9 537,83	-537,83
"	B	Produits chimiques	1 500	1 231,54	+268,46
"	C	Xérocopies (T à p) Chem. Abstr.	500	209,89	+290,11
"	D	Fournit. Bureau	1 000	1 440,62	-440,62
634-3	—	Documentation	2 000	1 947,89	+52,11
634-4	—	Timbres	500	387,50	+112,50
634-1	—	Déplacements	1 500	1 196,00	+304,00
872		Compte de transition.....Reste			48,73 F

.../...

Deux engagements de dépenses sont reportés sur le budget 1979 :

631-5 Réparation Matériel : 658,56 F

631-2 Entretien immeubles : 2 410,00 F.

Les dépenses ont pu être réparties harmonieusement tout le long de l'année et, somme toute, le bilan apparaît très satisfaisant. L'année 1979 marquera une certaine régression, mais celle-ci était prévue. Les nouvelles attributions sont résumées dans le chapitre suivant.

.../...

II - PREVISIONS 1979.

L'attribution d'équipement s'élève à 18 500 F (demande : 22 500 F)

. Les achats porteront sur : 1 balance électronique au 10^{-3} g

1 Etuve inox pour chromatographie

. Le dernier poste, en principe réservé à un Appareil Polaroïd, dépendra du solde.

L'attribution de fonctionnement reste : 16 000 F

. La nouvelle répartition est établie comme suit :

Compte	(subd.)	Définition	Attribution
634-1	(A)	Matériel de labo.	3 500
	(B)	Produits chimiques	2 500
	(C)	Xérox	1 000
	(D)	Fournitures bureau	1 000
			total partiel : 8 000 (12 000 en 78)
634-3		Documentation	2 500
634-4		Timbres	500
641-1		Déplacements	1 500
631-2		Entretien immeubles	2 500
631-5		Entretien matériel	1 000
			2e total partiel : 8 000 (4 000 en 78).

NB Compte tenu des frais immobiliers et de réparation de matériel, le compte 634-1 sera en forte régression en 1979.

.../...

CONCLUSION

CONCLUSION

Une hypothèse générale de travail a donc été présentée comme base des programmes à long terme du laboratoire de Biochimie ; sa validité est maintenant étayée par un ensemble de résultats expérimentaux tangibles illustrant l'intérêt du premier modèle choisi : " Glucides / Abeilles ", non seulement sur le plan de sa portée scientifique pure (régulation métabolique, théorie enzymologique) mais également en ce qui concerne ses incidences économiques (appréciation d'un potentiel de productivité agricole).

Il devrait donc pouvoir lui succéder, à brève échéance, une deuxième étape très importante dont le modèle serait illustré par le couple " Lipide / Noctuidés ", dont l'intérêt *a priori* a déjà été longuement discuté (rapports 1977).

La parole est donc maintenant à la Critique, dont les manifestations sont condannées à revêtir un caractère particulièrement imaginatif et constructif ... sous peine de rester sans suite ou paraître refutées d'avance. Elle devra également tenir compte, pour ajouter l'objectivité à la Pertinence, du contexte matériel et moral, dont le moins qu'on puisse dire est qu'il reste éprouvant !

Une étape importante est, en effet, sur le point d'être franchie : mais tandis que ses développements soulèvent déjà une foule de questions, de nouveaux projets prennent corps et attendent qu'il leur soit donné vie : toute la question est donc de trouver un équilibre entre le besoin d'approfondir et valoriser une innovation antérieurement acquise, et la nécessité d'aborder rapidement de nouvelles démarches créatrices (Créer, ... valoriser, ... créer ... etc.). Cet équilibre est d'autant plus difficile à réaliser que l'équipe est réduite à un seul Chercheur, pour qui, matérialiser simultanément ces deux concepts prend chaque jour l'aspect d'une gageure.

Il est dès lors aisé de comprendre que le pari ne peut-être tenu qu'au prix d'un effort permanent des gestion du temps et des moyens, et gagné qu'en faisant porter évidemment toute la mise sur le travail !

Pour qui ne s'imagine pas être illuminé par la flamme du génie, la création est le fruit d'un travail laborieux ponctué par une intense réflexion* : l'un suppose ordre, rigueur, soin, persévérance ; l'autre exige la stabilité dans le calme.

* " Une vie d'analyse pour une heure de synthèse " (Cl. BERNARD).

.../...

" La Science, c'est un Couvent " disait Leibnitz : j'invite donc tous ceux qui se laisseraient aller, éventuellement, à retirer une impression de malaise de la promiscuité d'une Unité dont l'austérité spontanée n'est que le reflet du respect de ces impératifs, à méditer sur le rapprochement de deux pensées : ...

> " Si vous ne vous retirez pas du monde pour vous abriter de son agitation et travailler en silence, vous ne ferez pas progresser la connaissance " (René LE SENNE),*

> " Tout acte créatif est anti-social " (Antonin ARTAUD),

... ou à focaliser leur Réflexion vers la signification du mot " Recherche " en regard de leurs propres objectifs.

le 28 février 1979

Michel BOUNIAS
Docteur ès Sciences

* D'après : Alain PEYREFITTE : " Le Mal Français " -Plon-.